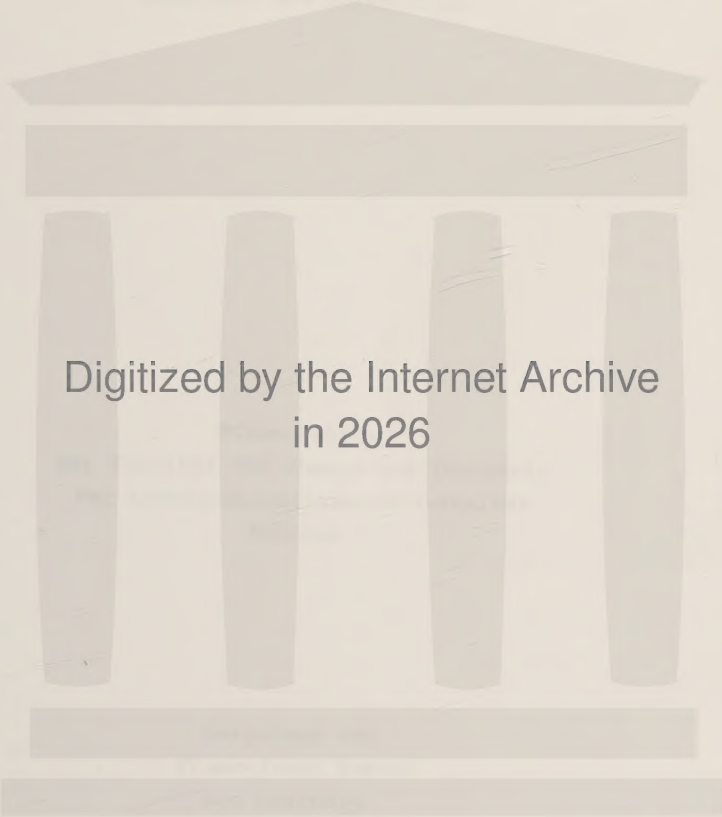


**Organisation
menschlicher Immunglobulingene:
Analyse variabler Gensegmente
innerhalb und außerhalb
des Kappa-Locus**

Franz-Josef Zimmer

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Organisation menschlicher Immunglobulingene:

Analyse variabler Gensegmente innerhalb und
außerhalb des Kappa-Locus

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Franz-Josef Zimmer
aus Saarburg

München 1989

vorgelegt am 19. Juni 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1989

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Juli 1985 bis Oktober 1988 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für seine Unterstützung und Betreuung. Allen Kollegen der Abteilung danke ich für gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bzw. werden teilweise veröffentlicht:

Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1987) J. Mol. Biol. 193, 241-253.

Klobeck, H.-G., Zimmer, F.-J., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 9655-9665.

Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34.

Adolph, S., Hameister, H., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 6241 (Kurzmitteilungen).

Lötscher, E., Zimmer, F.-J., Klopstock, T., Grzeschik, K.-H., Jaenichen, R., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1988) Gene 69, 215-223.

Lötscher, E., Siwka, W., Zimmer, F.-J., Grummt, F. und Zachau, H.G. (1988) Gene 69, 225-236.

Zimmer, F.-J., Hameister, H. und Zachau, H.G. (Manuskript in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	6
2.1.	Cosmidbanken.....	6
2.1.1.	Abgesuchte Cosmidbanken und isolierte rekombinante Cosmidklone.....	6
2.2.	Die B-Region: V-JC-Verknüpfung durch "chromosomal walking" und Versuche zur Extension in 5'-Richtung...	7
2.2.1.	Verbinden der V_K -Gene enthaltenden B-Region mit der C_K -Region.....	8
2.2.2.	Versuche zur Extension der 5'-Seite der B-Region.....	9
2.3.	Die W-Regionen: Extensionsversuche und Analyse der genomischen Organisation.....	10
2.3.1.	Extensionsversuche mit spezifischen Suchklonen.....	10
2.3.1.1.	Konstruktion von Extensionssuchklonen.....	12
2.3.1.2.	Teile der Wb-Region sind invers dupliziert.....	13
2.3.1.3.	Isolierung und Charakterisierung rekombinanter Cosmidklone, die die Wb-Region extendieren.....	14
2.3.1.4.	Versuche zur Extension der Wa-Region.....	16
2.3.1.5.	Charakterisierung rekombinanter Cosmidklone, die eine neue W-Region (Wc) repräsentieren.....	17
2.3.2.	Analyse der genomischen Organisation der W-Regionen.....	20
2.3.2.1.	Verwendung der Puls-Feld-Gelelektrophorese zur Strukturanalyse von Regionen im Bereich mehrerer Megabasen.....	20
2.3.2.2.	PFG-Analyse der W-Regionen: Amplicons in "Kopf-Kopf"- und "Schwanz-Schwanz"-Orientierung.....	21
2.3.2.2.1.	Die W-Regionen als V_K -Gene enthaltende Amplicons in "Kopf-Kopf"- und "Schwanz-Schwanz"-Orientierung.....	23

2.3.2.2.2.	Übersichtskartierung der W-Regionen mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese (OFAGE).....	26
2.3.2.3.	Die W-Regionen liegen auf dem langen Arm von Chromosom 2.....	29
2.3.2.4.	Bestimmung der Kopienzahl der W-Regionen im Genom relativ zu C_K	31
2.3.2.5.	Alu-Elemente befinden sich an den Übergängen von amplifizierter DNA zu nicht-amplifizierter DNA.....	35
2.3.2.5.1.	Klonierung und Sequenzanalysen der Amplicongrenzen in der Wb-Region.....	35
2.3.2.5.2.	Klonierung und Sequenzanalyse einer Amplicongrenze in der Wa-Region.....	38
2.3.2.6.	Sequenzanalysen der V_K -Gene W4, W8 und W11.....	40
2.3.2.6.1.	Klonierung und Sequenzierung der Gene W4, W8 und W11.....	41
2.4.	Das Gen Chr22-5: Produkt einer Überreplikation ?....	46
2.4.1.	Die Chr22-5-Genregion ist homolog zu anderen V_K -Orphonregionen.....	47
2.4.2.	Suche nach konservierten, Amplifikationen fördernden Elementen in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5.....	49
2.4.3.	Zwei konservierte Sequenzelemente in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 sind positiv in einem zellulären Transformationstest.....	52
2.4.4.	Lokalisierung der konservierten Sequenzelemente innerhalb des K-Locus.....	56
2.5.	Übersicht der bearbeiteten Cosmide und Subklone....	57
3.	Diskussion.....	62
3.1.	Probleme bei der Strukturaufklärung großer Abschnitte des Genoms.....	62
3.2.	Inversion der C_K -proximalen Gene B2 und B3 ist Voraussetzung für deren Umlagerungen an $J_K C_K$	64
3.3.	Die W-Regionen als Orphons auf Chromosom 2.....	66
3.4.	Die W-Regionen als Amplicons: Größe und Anordnung der amplifizierten Einheiten.....	67

3.5.	Evolution der W-Regionen: Sukzessive Amplifikationen führten zur Entstehung von Wa, Wb und Wc.....	69
3.6.	Führten Replikationsfehler zur Amplifikation einer W-Vorläuferregion ?.....	74
3.7.	Mögliche Bedeutung der CTC und NFIII-verwandten Sequenzelemente für die Entstehung bzw. weitere Amplifikation des Gens Chr22-5.....	78
3.8.	Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Entstehungsgeschichten der Chr22- und W-Regionen.....	80
4.	Materialien und Methoden.....	84
4.1.	Chemikalien und Enzyme.....	84
4.2.	Bakteriestämme, Vektoren und DNAs.....	85
4.3.	Zellkultur.....	86
4.4.	Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone.....	86
4.5.	Ausplattieren der Genbanken IIId und IIIE.....	87
4.5.1.	Herstellung von Phagenextrakten für die in vitro-Verpackung rekombinanter Cosmidklone.....	87
4.5.2.	In vitro-Verpackung und Transfektion der rekombinanten Cosmidklone.....	88
4.5.3.	Herstellung der Koloniefilter und Anreicherung von Cosmidklonen.....	89
4.6.	Präparation von DNA.....	89
4.6.1.	Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix....	89
4.6.2.	Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA.....	90
4.6.3.	Isolierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA aus M13-Klonen.....	90
4.7.	Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen.....	91
4.8.	Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen.....	91
4.8.1.	Konventionelle Gelelektrophorese bei konstantem, homogenem Feld.....	91
4.8.2.	Puls-Feld-Gelelektrophorese (OFAGE).....	92



4.8.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Präparation von Oligodesoxyribonukleotiden.....	92
4.9.	Klonierung von DNA-Fragmenten in M13- und Plasmid- Vektoren.....	93
4.10.	DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridi- sierungen.....	93
4.11.	Radioaktive Markierung von DNA.....	94
4.12.	Charakterisierung von Cosmidklonen durch Einzel- und Doppelspaltungen.....	94
4.13.	DNA-Sequenzierungen.....	95
4.14.	Kultivieren von Zellen.....	95
4.15.	Biologische Sicherheit.....	95
4.16.	Computerprogramme.....	96
5.	Zusammenfassung.....	97
6.	Literaturverzeichnis.....	101
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	110

Lebenslauf

1. Einleitung und Problemstellung

Das Immunsystem der Wirbeltiere setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Zellen zusammen; dazu zählen B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen. Die verschiedenen Zelltypen sind Differenzierungsprodukte der Knochenmarksstammzellen. Aufgabe des Immunsystems ist die Erkennung und Neutralisierung verschiedenster Antigene, die in den Organismus gelangen können. Je spezifischer das Erkennen körperfremder Substanzen erfolgt, desto effizienter kann das Abwehrsystem arbeiten. Für die spezifische Antigenerkennung sind im Immunsystem im wesentlichen zwei Moleküle verantwortlich: die von B-Zellen produzierten Antikörper sowie die T-Zellrezeptoren. Beide Moleküle besitzen variable (V) Anteile, die für die Antigenbindung verantwortlich sind und konstante (C) Bereiche, die die Effektorfunktion vermitteln (Übersicht in Ref. 50 und 151). Die genetische Basis für die Erzeugung antigenspezifischer Rezeptoren stellen mehrere Multigenfamilien dar.

Für die Bildung von Immunglobulinen, die sich aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten zusammensetzen, werden die Gene dreier verschiedener Loci benutzt (Übersicht in Ref. 50 und 151). Der IgH-Locus enthält die V-, D-, J- und C-Segmente der schweren Kette; die leichten Ketten der Antikörper werden durch die Gensegmente des λ - (V_λ , J_λ , C_λ) bzw. Kappa-Locus (V_K , J_K , C_K) kodiert.

Der menschliche Kappa-Locus (K-Locus), der ca. 100 V-Gensegmente (104, 107, 148, A. Meindl, unveröffentlicht), fünf J-Segmente und ein C-Segment (44) enthält, ist als Multigenfamilie auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 lokalisiert (83, 89).

Die Lokalisierung einzelner Mitglieder einer Multigenfamilie innerhalb eines definierten Genomabschnitts ist eine weitverbreitete Organisationsform von Multigenfamilien. Weitere Beispiele hierfür sind die T-Zellrezeptorloci (Übersicht in Ref. 25), der Haupt-Histokompatibilitätskomplex bei Maus und Mensch (143, 86) und der menschliche α -Interferon- (42) und β -Globin-Locus (37). Eine Alternative zur Organisationsform der bisher vorgestellten Multigenfamilien stellt die Organisation der tRNA-Gene der

Hefe (35) sowie die der Gene für ribosomale Proteine bei der Maus (27) dar. In den beiden zuletzt genannten Fällen sind die verschiedenen Mitglieder der jeweiligen Genfamilie über das Genom verstreut, d.h. die einzelnen Gene kommen auf unterschiedlichen Chromosomen vor.

Geht man davon aus, daß alle Mitglieder einer Multigenfamilie von einem einzigen Vorläufer abstammen, läßt sich die im Genom vorgefundene Organisationsform einer Multigenfamilie als das Ergebnis dreier Entwicklungsvorgänge erklären: 1. der Bildung der ersten zusätzlichen Kopie des Vorläufers; 2. der weiteren "Expansion" (Erhöhung der Kodierungskapazität) der Genfamilie durch Amplifikationen einzelner Mitglieder; 3. der "Kontraktion" (Verringerung der Kodierungskapazität) der Multigenfamilie durch Deletionen und Mutationen einzelner Mitglieder.

Die erstmalige Amplifikation eines einzelnen Vorläufers ist wahrscheinlich das kritische und am schwersten erklärbare Ereignis in der Entstehungsgeschichte einer Multigenfamilie. Obwohl bereits mehrere Genfamilien untersucht worden sind (Übersicht in Ref. 82), gibt es wenige Informationen über die Natur der frühen Duplikationsereignisse. Diese frühen Vorgänge sind schwierig zu analysieren, da die meisten bekannten Multigenfamilien bereits früh in der Evolution entstanden sind und die Produkte des ersten Amplifikationsereignisses durch Mutationen inzwischen soweit verändert worden sind, daß die gegenwärtigen Nukleinsäuresequenzen nicht mehr die ursprüngliche Situation repräsentieren.

Jüngere Vorgänge in der Evolution, die an der Expansion der Genfamilien beteiligt waren, können besser analysiert werden. Es kommen im wesentlichen vier verschiedene Mechanismen in Frage, die zur Entstehung zusätzlicher Genkopien führen können; das sind homologe und nicht-homologe ungleiche Cross-over, Retrotranskription der RNA der transkribierten Mitglieder der Genfamilie und Überreplikation (Übersicht in Ref. 82). Die beiden erstgenannten Vorgänge sollten höchstens zu einer Verdopplung der Mitgliederzahl der Multigenfamilie pro Amplifikationsschritt führen und die zusätzlich gebildeten Kopien sollten in "räumlicher Nachbarschaft" zur Ausgangsregion lokalisiert sein. Retrotranskription und Überreplikation dagegen können zu einer Vervielfachung der Kopienzahl pro Ereignis führen und die neu gebildeten Kopien

können an verschiedenen Stellen ins Genom integriert werden. Die durch Retrotranskription amplifizierten Einheiten sind maximal einige kb groß, während durch Überreplikation über 3000 kb große Bereiche amplifiziert werden können (Übersicht in Ref. 141). Retrotranskriptionsvorgänge waren wahrscheinlich an der Entstehung der Alu-Familie, einer hoch-repetitiven Sequenzfamilie mit ca. 300000 Kopien im Genom, beteiligt (57).

Für Amplifikationen, die große DNA-Abschnitte betreffen, konnte die Rate für spontan (ohne Selektionsdruck) erfolgende Amplifikationsereignisse ermittelt werden. Anhand von FACS- (fluorescence activated cell sorting) Analysen konnte für den Dihydrofolatreduktase- (dhfr) Locus eine Amplifikationsrate von 10^{-3} bis 10^{-4} Ereignissen pro Zelle pro Generation (58) ermittelt werden. Unter der Annahme, daß die durchschnittliche Größe eines amplifizierten Bereichs 1000 kb beträgt, bedeutet die ermittelte Amplifikationsrate, daß in einem diploiden Genom von 6×10^9 bp ein Amplifikationsereignis pro Zellteilung erfolgt (141). Die Produkte der Amplifikationsvorgänge sind in der Regel invertiert angeordnete amplifizierte Einheiten (Amplicons). Als mögliche Mechanismen der Amplifikation großer Bereiche wurden neben dem sogenannten "Zwiebelschalen"-Modell (123, 11) in jüngster Vergangenheit Modelle entwickelt, anhand derer die Ausbildung einer invertierten Anordnung von Amplicons erklärt werden kann (54, 101, 120). Allen Modellen gemeinsam ist, daß Fehler während der Replikation zur Amplifikation des jeweiligen Bereichs führen.

Von den bisher beschriebenen Vorgängen, die möglicherweise an der Expansion einer Multigenfamilie beteiligt sind, können homologe und nicht-homologe Cross-over auch zum Verlust von Genen aus einer Multigenfamilie, d.h. zu deren Kontraktion führen. Beispiele hierfür sind im Haptoglobin- bzw. β -Globin-Locus zu finden (Übersicht in Ref. 82). Bei letzterem beispielsweise führte ein ungleiches Cross-over zwischen δ - und β -Globingenen zum Verlust des β -Globingens auf dem "Lepore-Allel" (91); dieses Allel enthält ein δ/β -Hybridgen, dessen Translationsprodukt im Hämoglobin Lepore enthalten ist. Zu den Kontraktionsvorgängen einer Multigenfamilie, d.h. den Ereignissen, die eine Verminderung der Kodierungskapazität zur Folge haben, sind auch Mutationen und im speziellen Fall der Immunglobulinloci zusätzlich Transpositio-

nen, zu zählen. Die Entfernung von variablen Gensegmenten ohne J- bzw. C-Segmente aus dem angestammten Locus und deren Transpositionen auf andere Chromosomen ist ein Mechanismus, der die Kodierungskapazität der betreffenden Multigenfamilie verringert. Obwohl die transponierten V-Gensegmente für funktionelle variable Proteindomänen kodieren können, ist deren Verwendung zur Antikörperbildung unwahrscheinlich, da die V-J-Umlagerung transponierter Gensegmente mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr möglich ist. Die Umlagerung ist jedoch eine Voraussetzung für die Bildung funktioneller leichter bzw. schwerer Ketten. In der Regel sind Transpositionen von Mitgliedern einer Multigenfamilie nicht gleichbedeutend mit einer Kontraktion der jeweiligen Genfamilie. Falls die transponierten Gene weiterhin exprimiert werden können, hat die Transposition einiger ihrer Mitglieder keinen Einfluß auf die Kodierungskapazität der Multigenfamilie.

Ein Ziel der Arbeitsgruppe von Professor Zachau ist die vollständige Klonierung des menschlichen K-Locus. Die erhaltenen Strukturdaten sollen zum einen Informationen über Prinzipien der eukaryontischen Genomorganisation und -evolution liefern und zum anderen eine Abschätzung der Bedeutung des V_K -Keimbahnrepertoires für die Diversitätserzeugung der Antikörper ermöglichen.

Bis zum Beginn der eigenen Arbeiten bzw. in deren weiteren Verlauf konnten große Bereiche des menschlichen K-Locus durch Isolierung und Charakterisierung überlappender Cosmidklone analysiert werden (80, 105, 107, 148). Diese Analysen zeigten, daß große Teile des Locus dupliziert sind und die V_K -Gene innerhalb der verschiedenen, duplizierten Regionen in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert sind. Eine Ausnahme stellt die B-Region dar; diese ist weder dupliziert, noch besitzen die Gene B1, B2 und B3 dieselbe Transkriptionsrichtung (80). Aufgrund von Hybridisierungsanalysen lymphoider Zelllinien mit Proben aus der B-Region bestand die Vermutung, daß diese Region die J_K -proximalen V-Gene enthalten könnte (67). Dieser Verdacht konnte durch PFG-Analysen des K-Locus erhärtet werden (79). Diesen Daten zufolge würde der Abstand zwischen $J_K^C K_K$ und dem Gen B3 weniger als 150 kb betragen.

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildeten drei Regionen, die im Rahmen der Strukturaufklärung des K-Locus von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe isoliert worden waren. Als Region werden durch überlappende Cosmid- und Phagenklone isolierte Abschnitte des Genoms bezeichnet.

Durch "chromosomal walking" sollte die B-Region in 5'- und 3'-Richtung mit dem Ziel extendiert werden, diese in einer der beiden Richtungen mit $J_K C_K$ durch überlappende Cosmide zu verknüpfen.

Weitere, V_K -Gene enthaltende Bereiche stellen die W-Regionen dar. Bis zum Beginn der eigenen Arbeiten waren bereits zwei W-Kopien identifiziert worden (107). Es sollte versucht werden, diese Regionen entweder durch "chromosomal walking" mit anderen klonierten Abschnitten des K-Locus zu verknüpfen oder unter Verwendung von Puls-Feld-Gelelektrophorese die relative Lage der W-Kopien zum K-Locus zu ermitteln. Im Verlauf der Charakterisierung dieser Regionen, die sich zum Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation entwickelte, mehrte sich der Verdacht, daß die W-Kopien keinen funktionellen Bestandteil des K-Locus darstellen sondern transponiert sind. Weitere Untersuchungen zur Struktur und Organisation der W-Regionen sollten auch Informationen liefern, die zum Verständnis ihrer Evolution beitragen.

Die dritte zu bearbeitende Region stellte eine sogenannte Orphonregion dar, die auf Chromosom 22 lokalisiert ist (76). Ein Gen dieser Region, das Gen Chr22-5, ist Mitglied einer Gruppe eng verwandter $V_K I$ -Orphongene. Diese Genregion sollte auf Sequenzebene mit dem Ziel analysiert werden, Informationen über Amplifikations- und Transpositionsmechanismen, die an der Entstehung dieser Region beteiligt waren, zu erhalten.

2. Ergebnisse

2.1. Cosmidbanken

Zur Klonierung großer, zusammenhängender Bereiche eines beliebigen Genoms bietet sich das Klonieren in Cosmidvektoren besonders an. Diese Vektoren ermöglichen es, bis zu 50 kb große DNA-Fragmente mit hoher Effizienz in E.coli zu transfizieren (47) und zu vermehren (20, 21). Somit ist man, im Gegensatz zum Klonieren mit Plasmiden oder Derivaten des λ -Phagen (96), in der Lage, durch Isolierung relativ weniger überlappender Cosmidklone aus Genbanken große Abschnitte des Genoms (mehrere 100 kb) zu analysieren. Diese Klonierungstechnik hat z.B. zur Strukturaufklärung des MHC-Locus der Maus wesentlich beigetragen (143, 155).

2.1.1. Abgesuchte Cosmidbanken und isolierte rekombinante Cosmidklone

Zur Herstellung der Genbanken IIIId und IIIe wurde mit Sau3A partiell gespaltene DNA, die durch H.-D. Pohlenz in Vektorarme ligiert worden war (106), verwendet. Es wurden je 3×10^5 bzw. 6×10^5 Kolonien auf Membranfiltern (22x22 cm, Gene Screen plus, NEN) ausplattiert (144). Legt man eine statistische Verteilung der Cosmidklone über das Genom zugrunde, so kann man die Auffindwahrscheinlichkeit einer beliebigen Sequenz berechnen (19). In der Genbank IIIId war demnach theoretisch jede Sequenz des Genoms mit einer Wahrscheinlichkeit von 98,8% vertreten. Es wurden zwei Sätze von Replikafiltern angelegt, da diese Genbank mit mehreren Suchklonen abgesucht werden sollte. Dies gilt auch für die anschließend etablierte Genbank IIIe, in der mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,98% jede beliebige Sequenz des humanen Genoms vertreten sein sollte. Eine Zusammenstellung der abgesuchten Cosmidbanken und der daraus isolierten Cosmide befindet sich in der Tabelle 1.

Tabelle 1: Abgesuchte Cosmidbanken und daraus isolierte Cosmide

Genbank (Ref.)	Partialspe. mit	Vektor	Anzahl Kolonien	Suchklon	isol. Cosmid
IIIId (106)	Sau3A	pHC79 pJB8	3×10^5	m165-5 m654-1	Wo1-Wo6 239, 240 238
IIIe (106)	Sau3A	pHC79 pJB8	6×10^5	m165-5 mAF2-10 m111-7	Wo7-Wo14
607 (65)	HindIII	Lorist2	6×10^5	mAF2-10 m111-7	607/6
V (78)	BglII	pHC79	6×10^5	m654-1 m111-7	752-775
VI (78, 100)	MspI	pHC79	6×10^5	m111-7	

Die Suchklone werden in den Kapiteln 2.2. (mAF2-10, m111-7) und 2.3.1.1. (m165-5, m654-1) beschrieben, die isolierten Cosmide in 2.2.1. (cos607/6), 2.3.1.3. (cos238, cos752-775) und 2.3.1.4. (cos239, 240 und Wo1-14).

2.2. Die B-Region: V-JC-Verknüpfung durch "chromosomal walking" und Versuche zur 5'-Extension

Abb. 1 zeigt eine Restriktionskarte der B-Region, wie sie aus dem Cosmidklon cos111 (106) und den λ -Phagen λ AF-1 und λ AF-2 (67) konstruiert wurde. Die Klone m111-7 und mAF2-10 wurden von W. Lorenz bzw. H.-G. Klobeck für die Extensionsversuche zur Verfügung gestellt.

Regionen feststellen zu können, wurde der Suchklon m607/6-1 konstruiert. Dieser wurde zur Hybridisierung von Filtern, die DNA aller bisher isolierter Cosmide des K-Locus enthalten, verwendet. Dabei ergab cos141 (62) ein positives Signal. Durch anschließende Hybridisierungsversuche mit der Probe pC-2 (63) konnten die $J_K C_K$ -Segmente in einem Abstand von 23 kb zu dem Gen B3 lokalisiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt war bei keinem der Immunglobulin-Loci von Säugern die V-Gene enthaltende Region mit der (D)-J-C-Region verknüpft worden. Bemerkenswert ist die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung der Gensegmente B3 und $J_K C_K$. Dies ist für zu diskutierende Umlagerungsmechanismen von Bedeutung, wie sie in Abschnitt 3.2. noch behandelt werden. Die Abb. 3 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der verknüpften B- und $J_K C_K$ -Regionen.

2.2.2. Versuche zur Extension der 5'-Seite der B-Region

Mit dem Klon m111-7 (Abb. 1) sollte versucht werden, die B-Region in 5'-Richtung zu extendieren. Obwohl mehrere Cosmidbanken abgesucht wurden (Tabelle 1), konnten keine mit dem Klon hybridisierenden Cosmide isoliert werden.

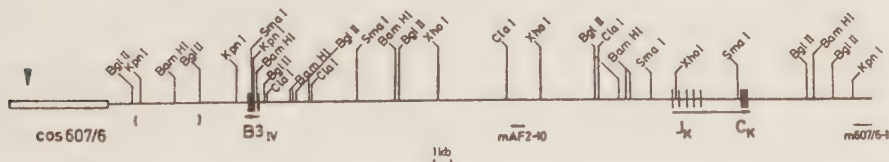


Abb. 2: Der Cosmidklon cos607/6 verknüpft die B-Region mit der C_K -Region

Der Abstand zwischen dem V_K -Gen B3 und $J_K C_K$ beträgt 23 kb. Zu beachten ist die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung der Gensegmente. Die Position der NruI-Stelle des Vektors Lorist 2 ist durch ein Dreieck markiert. In dem mit Klammern gekennzeichneten Abschnitt des Cosmids befinden sich drei weitere BglII-Stellen, die nicht kartiert wurden (Abb. 1). Die Lage der Klone mAF2-10 und m607/6-1 ist unter der Karte angegeben.

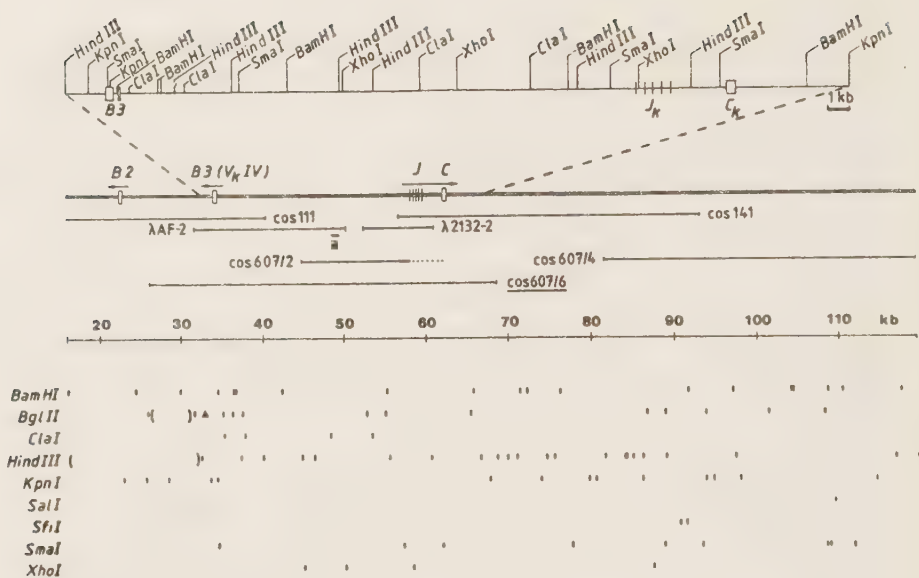


Abb. 3: Übersichtskarte der BJ_{KK}-Region

Die Abbildung ist Ref. 65 entnommen und zeigt die Lage des Klon cos607/6 innerhalb der BJ_{KK}-Region. Die weiteren Cosmid- und Phagenklone wurden von H.-G. Klobeck isoliert (106, 62, 65, 67). Die Lage des Suchklons mAF2-10 ist durch a markiert. Senkrechte Striche geben die Positionen der Spaltstellen an. Die als Dreieck eingezeichnete BglII-Stelle ist in cos607/6 nicht vorhanden. In den mit Klammern versehenen Abschnitten wurden BglII und HindIII nicht kartiert.

2.3. Die W-Regionen: Extensionsversuche und Analyse der genomischen Organisation

2.3.1. Extensionsversuche mit spezifischen Suchklonen

Die Anteile der W-Regionen, die zu Beginn der eigenen Extensionsversuche durch Cosmidklone repräsentiert waren, sind in Abb. 4 dargestellt (107). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun versucht

werden, die Wa- und Wb-Regionen unter Verwendung spezifischer Extensionssuchklone in 5'-Richtung zu extendieren. Extensionsversuche in 3'-Richtung wurden nicht durchgeführt, weil die bereits klonierten, ausgedehnten genfreien Bereiche der Wa- und Wb-Regionen (Abb. 4) 3' keine weiteren Gene erwarten ließen.

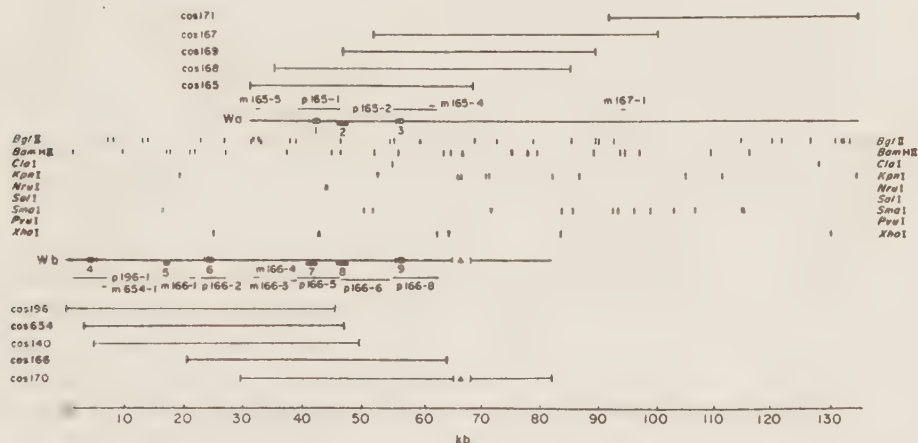


Abb. 4: Restriktionskarte der W-Regionen zu Beginn der Extensionsversuche

Die Karte entspricht derjenigen aus Ref. 107 in leicht veränderter Form. Sie wurde von H.-D. Pohlentz aus den eingezeichneten Cosmidklonen konstruiert (107). Die Regionen Wa und Wb sind so angeordnet, daß homologe Bereiche die gleichen Kartenpositionen einnehmen. Senkrechte Striche markieren Spaltstellen, die an den gleichen Positionen in beiden Regionen vorkommen oder nur durch eine Region repräsentiert sind. Unterschiede in den Spaltstellen zwischen Wa und Wb sind durch ausgefüllte Dreiecke gekennzeichnet. Die Spitze zeigt auf die Region, in der die entsprechende Spaltstelle vorhanden ist. Eine Deletion von 1 kb an der Kartenposition 65 kb ist durch ein Dreieck markiert. Sequenzierte V_K -Gene sind mit ihrem Signalpeptidanteil als Rechtecke in die Karte eingezeichnet; durch Hybridisierung nachgewiesene V_K -Gene sind unterhalb der Karte dargestellt. Das Gen W4 ist fälschlicherweise als sequenziert eingezeichnet, da der Klon p196-1, aus dem das Gen subkloniert wurde, aus dem 3'-terminalen Bereich von cos196 stammt. Er enthält das Gen W7. Die Klone cos654, m654-1 und m165-5 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kartiert bzw. konstruiert (2.3.1.1.).

2.3.1.1. Konstruktion von Extensionssuchklonen

Für die Versuche zur Extension von Wb in 5'-Richtung sollten aus dem Klon cos654 (Abb. 4), der im Rahmen dieser Arbeit kartiert wurde, ein Suchklon konstruiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein 2,5 kb großes Fragment, ausgehend von der BglIII-Stelle bei Kartenposition 7 kb (Abb. 4) bis zur SalI-Stelle des Vektors pH79 isoliert, mit AluI nachgespalten und in SmaI-gespaltenen M13mp10-Vektor ligiert. Die erhaltenen rekombinanten M13-Klone wurden auf ihre Spezifität hin getestet, d.h. es wurde untersucht wieviele verschiedene Regionen des Genoms mit einem bestimmten Suchklon hybridisieren. Dazu wurden Hybridisierungsfilter benutzt, die gespaltene Plazenta-DNA enthielten (4.10.). Die Filter werden mit dem zu testenden, radioaktiv markierten Klon (4.11.) hybridisiert. Das Ergebnis einer solchen Hybridisierung ist in Abb. 5 für den Klon m654-1 gezeigt. Weitere Hybridisierungsversuche mit



Abb. 5: Prüfung des Suchklons m654-1 durch Hybridisierung mit gespaltener Plazenta-DNA

Der M13-Klon enthält ein 1 kb großes AluI-Fragment aus cos654 (Abb. 4) und hybridisiert an drei Stellen innerhalb der W-Regionen (Abb. 10); die verschiedenen hybridisierenden Bereiche unterscheiden sich jedoch nicht in den Größen der BglIII- und BamHI-Fragmente.

allen bisher isolierten Cosmiden der W-Regionen ergaben, daß der Klon neben seiner Ausgangssituation an zwei weiteren Stellen innerhalb der W-Regionen hybridisiert (2.3.1.2.).

Obwohl die Möglichkeit bestand, mit m654-1 auch Wa zu extendieren (Abb. 10), wurde versucht, aus cos165 (Abb. 4) einen nur die Wa-Region erkennenden Suchklon zu konstruieren. Da der Bereich zwischen der Kartenposition 30 und 35 kb (Abb. 4) weder Spaltstellenhomologie zu Wb zeigt, noch isolierte Fragmente dieses Abschnitts zum anderen Duplikat hybridisieren, bestand die Möglichkeit aus dieser Region einen entsprechenden Suchklon zu konstruieren. Zu diesem Zweck wurde das randständige 1,2 kb große BglII-Fragment von cos165 mit Sau3A nachgespalten und das gesamte Gemisch in BamHI-gespaltenen M13mp10-Vektor ligiert. Es wurden verschiedene rekombinante M13-Klone, die unterschiedlich große Sau3A-Fragmente enthalten, wie m654-1 getestet. Der Klon m165-5 (Abb. 10), der ein 0,9 kb Sau3A-Fragment enthält, wurde für die Extensionsversuche eingesetzt (2.3.1.4.), obwohl er in gespalte-ner Plazenta-DNA vier Banden erkennt.

2.3.1.2. Teile der Wb-Region sind invers dupliziert

Eine Charakterisierung der bereits in 2.3.1.1. erwähnten zusätzlichen Hybridisierungsstellen des Klons m654-1 innerhalb der W-Regionen ergab, daß sich diese in den nahen 5'-Flanken der Gene W7 und W1 (Abb. 4) befinden. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend da angenommen wurde, daß der Klon aus der 3'-Flanke des Gens W4 stammt. Orientierung von W4 durch Feinkartierung zeigte jedoch, daß der Klon m654-1 ebenfalls aus der 5'-Flanke dieses Gens stammt (Abb. 4). Dies bedeutet, daß die Gene W4 und W7 unterschiedliche Transkriptionsrichtungen innerhalb der Wb-Region haben, was einer Inversion dieser Bereiche entspricht. Nähere Charakterisierung des Cosmidklons cos654 ergab, daß die invertierte Duplikation in 5'-Richtung bei Kartenposition 45 kb beginnt (Abb. 10). Der Bereich zwischen Position 45 und 57 kb ist nicht dupliziert. Isolierte Fragmente aus diesem Abschnitt hybridisieren an keine weiteren Stellen innerhalb der W-Regionen. Die minimale Ausdehnung der Inversion betrug danach 12 kb.

2.3.1.3. Isolierung und Charakterisierung rekombinanter Cosmidklone, die die Wb-Region extendieren

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, welche Cosmidbanken mit m654-1 abgesucht wurden. Der aus Genbank IIId isolierte Klon cos238 extendierte die Wb-Region um 13 kb in der 5'-Richtung. Bei sich anschließenden Versuchen stellte sich jedoch heraus, daß der Klon das Ergebnis eines Ligierungsartefaktes war, bei dem ein 4 kb großes Fragment von einer anderen Region auf Chromosom 2 an ein Fragment aus der Wb-Region ligiert worden war. cos238 extendierte somit die Wb-Region nur um 9 kb und vergrößerte das Ausmaß der klonierten invertierten Duplikation auf 21 kb (nicht gezeigt).

Da es aufgrund der Inversion unwahrscheinlich erschien, einen Suchklon für die Wb-Region konstruieren zu können, der nur den 5'-terminalen Bereich erkennt (beim damaligen Stand Kartenposition 20 kb; Abb. 10) und nicht auch die dazu homologe Region im inneren Bereich von Wb (Kartenposition 82 kb; Abb. 10), wurde der Klon m654-1, obwohl er 16 kb vom 5'-Ende entfernt liegt, erneut zum Absuchen einer Genbank verwendet. Die aus Cosmidbank V isolierten Cosmide und deren Anordnung innerhalb von Wb sind in der Abb. 7 dargestellt. Die Restriktionskarte von cos752, der die Wb-Region am weitesten in 5'-Richtung extendiert, ist in Abb. 6 gezeigt. Das Ausmaß der invertierten Duplikation beträgt danach 42 kb. Eine Deletion von 1 kb an Position 91 kb (Abb. 10) ist der

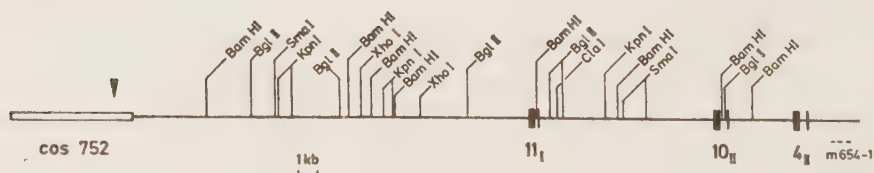


Abb. 6: Restriktionskarte des Cosmidklons cos752

Das Dreieck gibt die PvuI-Stelle des Vektors pH79 an. Der Hybridisierungsort des Extensionssuchklons m654-1 ist unter der Restriktionskarte eingezeichnet. Die Orientierung der Karte ist so gewählt, daß sie derjenigen aus Abb. 10 entspricht.

einzigste Unterschied, der durch Restriktionskartierung zwischen den beiden invertierten Blöcken gefunden wurde. Die Wb-Region enthält somit innerhalb von 108 kb acht V_K -Gene der Subgruppen I, II und III.

Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diejenigen Abschnitte der W-Regionen, die in mehr als einer Kopie im Genom vorkommen, als amplifiziert bezeichnet. Der Grund hierfür sind die strukturellen Ähnlichkeiten dieser Abschnitte (2.3.2. ff) mit denjenigen in der Literatur beschriebener amplifizierter Bereiche.

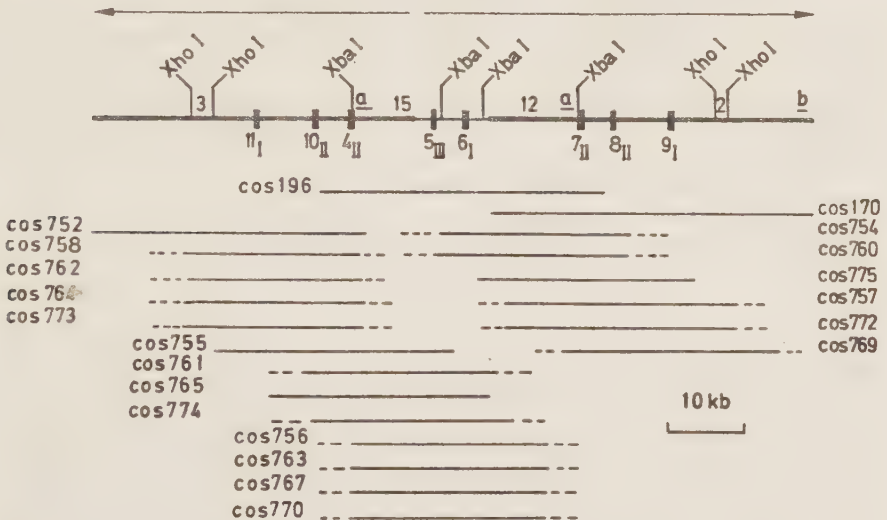


Abb. 7: Anordnung von Cosmiden der Wb-Region, die mit dem Extensionssuchklon m654-1 isoliert wurden

Da der Klon m654-1 zweimal innerhalb von Wb hybridisiert, wurden zwei Sätze an Cosmiden isoliert, von denen eine Gruppe dem 5'-Bereich und eine dem 3'-Bereich zugeordnet wurde. Die Cosmidklone cos196 und cos170 decken den Bereich von Wb ab, der bereits durch H.-D. Pohlenz kloniert wurde (107). Amplifizierte Abschnitte sind durch stärkere Striche gekennzeichnet. Die Transkriptionsrichtung der Gene innerhalb der invertierten Blöcke ist durch zwei Pfeile oberhalb der Karte angegeben. Die Zuordnung der Cosmide zur linken oder rechten Kopie erfolgte nach Hybridisierungen mit den Klonen a (m654-1) und b (m170-1) sowie nach Spaltungen mit XhoI und XbaI. Cosmidklone, die zur 5'-Seite gehören besitzen ein 3 kb XhoI- und ein 15 kb XbaI-Fragment, zur 3'-Seite gehörende Klone ein 2 kb XhoI- und ein 12 kb XbaI-Fragment. Gestrichelte Linien geben an, daß die genaue Lage des jeweiligen Cosmidklons nicht bestimmt wurde.

2.3.1.4. Versuche zur Extension der Wa-Region

Da sowohl beim Absuchen der Genbank IIIId als auch der Bank IIIe mit dem Klon m654-1 keine die Wa-Region extendierende Cosmidklone isoliert werden konnten (Abb. 8), wurden diese Banken zusätzlich

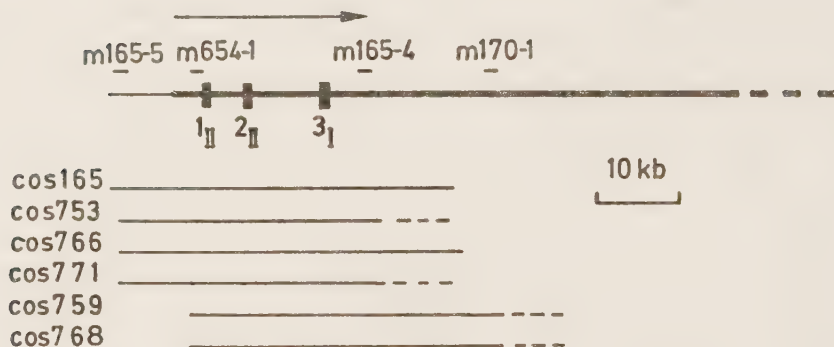


Abb. 8: Anordnung von Cosmiden der Wa-Region, die mit dem Extensionssuchklon m654-1 isoliert wurden

Eingezeichnet ist der dritte Satz an Cosmiden, der mit m654-1 isoliert wurde (vgl. Legende zu Abb. 7). Der Klon cos165 deckt den 5'-Bereich von Wa ab, der bereits durch H.-D. Pohlenz kloniert wurde (107). Die Einordnung der Cosmide erfolgte aufgrund von Hybridisierungen mit den Klonen m165-5, m654-1, m165-4 (107) und m170-1 sowie anhand von Fragmenten, die für Wa charakteristisch sind.

mit dem Klon m165-5 der Wa-Region (Abb. 10) abgesucht. Es konnten 16 Cosmide isoliert werden (Wol-14, cos239 und cos240; Tabelle 1), von denen jedoch keins zur Wa-Kopie gehört. Bei allen Klonen hybridisieren BglII-Fragmente anderer Größen als beim Ausgangs-cosmid cos165 mit dem Suchklon. Diese BglII-Fragmente entsprechen denjenigen, die in Plazenta-DNA zusätzlich zu dem Originalfragment von 1,2 kb durch m165-5 erkannt werden. Auf den Cosmiden cos 239 und cos240 konnten in Hybridisierungsversuchen je ein V_K -Gen lokalisiert werden. Aus diesem Grund wurden sie genauer charakterisiert. Ein Vergleich der erstellten Restriktionskarten mit den-

jenigen anderer Cosmide ergab, daß cos239 und cos240 Ähnlichkeiten in den Spaltstellenabfolgen zu Cosmiden der Z-Familie (147) aufweisen. Die V_K -Gene von cos239 und cos240 sind jedoch, wie sich aus den Kartierungsdaten ergibt, nicht identisch mit den V_K -Genen von Z1 bis Z4 (147). Eine eindeutige Zuordnung zu einer der Subgruppen I bis III war nicht möglich, da die beiden Gene von cos239 und cos240 mit den Proben m1-3 (V_{KI} ; Ref. 56) und m41-7 (V_{KIII} ; Ref. 66) gleich stark hybridisieren (100 mM Phosphat, 68°C im letzten Waschschrift).

Die Cosmide Wol-14 wurden nicht weiter bearbeitet, da sie weder V_K -Gene enthalten, noch die mit m165-5 hybridisierenden Fragmente die richtigen Größen aufweisen. Es ist somit nach wiederholten Versuchen nicht gelungen, eine Extension von Wa zu erreichen.

2.3.1.5. Charakterisierung rekombinanter Cosmidklone, die eine neue W-Region (Wc) repräsentieren

Das Kartieren von NotI-Stellen in Cosmiden der W-Regionen ist für die in 2.3.2.2. und 2.3.2.3. beschriebenen Versuche von Bedeutung. Dadurch wurden zwei verschiedene Gruppen von Cosmiden identifiziert, die bis zu diesem Zeitpunkt Wa zugeordnet waren (106). Die in Klonen der Wa-Region identifizierte NotI-Stelle

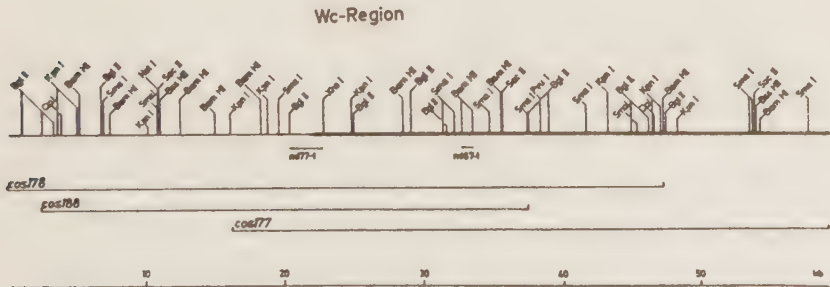


Abb. 9: Restriktionskarte der Region Wc

Die Karte wurde aus den eingezeichneten Cosmidklonen konstruiert. Die gestrichelte Linie markiert ein BamHI-Fragment, das mit dem Klon m167-1 aus Wa (107; vgl. Abb. 10) hybridisiert.

Abb. 10: Zusammenfassende Darstellung der W-Regionen nach den Extensionsversuchen

Die verwendete Symbolik entspricht derjenigen der Abb. 4. Bereiche, die mit Klonen anderer Regionen hybridisieren sind durch gestrichelte Linien markiert. Amplifizierte Abschnitte sind durch einen stärkeren Strich gekennzeichnet. In dem nicht-amplifizierten Abschnitt von Wc ist jede kartierte Spaltstelle gesondert eingezeichnet. Die Pfeile an der Wb- bzw. Wa-Region geben die Transkriptionsrichtung der Gene innerhalb der jeweiligen Blöcke an. Ein Punkt markiert eine allelische NruI-Stelle in Wa bei Kartenposition 72 kb. Die eingezeichneten Cosmide sind so gewählt, daß durch sie jede Region vollständig repräsentiert wird.

(Kartenposition 126 kb) in Abb. 10, ist in den Cosmiden cos177, cos178 und cos188 nicht vorhanden (die NotI-Stelle fehlt an Position 36 kb in Abb. 9). Diese Cosmide repräsentieren eine weitere Region, die als Wc bezeichnet wird. Die Analyse BglII/NotI-gespaltener DNA 20 verschiedener Individuen mit dem Klon m167-1 (107) zeigt, daß diese sowohl die Region Wa, repräsentiert durch ein 4 kb großes Fragment (Abb. 10), als auch die Region Wc, repräsentiert durch ein 6 kb großes Fragment (Abb. 10), enthalten. Zusätzlich zu diesem Unterschied in der NotI-Stelle konnte ein Homologieabbruch zwischen Wa und Wc durch Restriktionskartierung identifiziert werden (Kartenposition 109 kb in Abb. 10). Die Karte der Region Wc zeigt 5' des Abbruchs keinerlei Ähnlichkeiten in der Spaltstellenabfolge zu den Karten der Regionen Wa und Wb. Innerhalb von Wc konnten keine V_K -Gene identifiziert werden. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Homologie zu den V_K -Gene enthaltenden Regionen Wa und Wb 3' des letzten Gens W3 bzw. W9 beginnt (Abb. 10). Innerhalb der homologen Bereiche (stärkere Strichdicke in Abb. 10) gibt es außer dem NotI-Spaltstellenunterschied einige weitere Unterschiede zwischen Wa und Wc. Jedoch hybridisieren Klone aus diesen Abschnitten, m177-1 aus Wc bzw. m167-1 aus Wa (107), unter stringenten Bedingungen (40 mM Phosphat, 68°C im letzten Waschschrift) mit den entsprechenden Fragmenten des anderen Duplikats (durch gestrichelte Linien markierte Fragmente in Abb. 10). Daß es sich bei der Region Wc um eine weitere W-Kopie und nicht um eine allelische Variante von Wa oder Wb handelt, wird durch die in 2.3.2.4. beschriebenen PFG-Analysen deutlich.

2.3.2. Analyse der genomischen Organisation der W-Regionen

2.3.2.1. Verwendung der Puls-Feld-Gelelektrophorese zur Strukturanalyse von Regionen im Bereich mehrerer Megabasen

Im Gegensatz zur üblichen Elektrophorese, die bei konstantem, homogenem elektrischem Feld durchgeführt wird und in der Regel zur Auftrennung von Fragmenten bis zu 20 kb verwendet wird, arbeitet man bei der Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFG) mit einem periodisch wechselnden elektrischen Feld, was zu periodischen Änderungen der Wanderungsrichtung der DNA-Fragmente während der Elektrophorese führt. Dies erlaubt eine Auftrennung von Fragmenten bis zu einer Größe von 9 Mb (7, 138). Das erste dieser Elektrophoresesysteme wurde 1982 von Schwartz und Cantor (133) vorgestellt. In diesem Fall wird zwischen einem inhomogenen und homogenen elektrischen Feld umgeschaltet. Bei der von Carle und Olson (16) eingeführten Variante dieses Systems, der "orthogonal field alternation"-Gelelektrophorese (OFAGE), wird zwischen zwei inhomogenen Feldern umgeschaltet. Diese Technik wurde in der Arbeitsgruppe durch B. Straubinger etabliert (146) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Strukturuntersuchungen der W-Regionen angewendet. Da das Molekulargewicht der mit PFG aufzutrennenden Fragmente um zwei Größenordnungen über denen der mit herkömmlicher Elektrophorese zu trennenden Fragmente liegt, sind die üblichen Restriktionsnukleasen für diese Versuche ungeeignet. Sie spalten in der Regel zu häufig und ergeben hauptsächlich Spaltprodukte bis ca. 20 kb. Zur Erzeugung großer Fragmente werden deshalb selten-spaltende Nukleasen verwendet (13, 73).

Eines der ersten Beispiele für die Anwendung dieser Technik zur Kartierung großer Abschnitte des Genoms ist die in der Arbeitsgruppe von McDevitt durchgeführte PFG-Analyse des humanen Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (HLA-Locus; 41)

Für die PFG-Experimente dieser Arbeit wurde die Zelllinie PC-3 (60) verwendet, da deren DNA einen niedrigen Methylierungsgrad aufweist und somit auch CpG-methylierungssensitive Restriktionsnukleasen zur Kartierung verwendet werden konnten. Abb. 11 zeigt

das Ergebnis einer Auftrennung von gespaltener PC-3-DNA mit Hilfe der OFAGE, wie sie in den meisten PFG-Experimenten in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

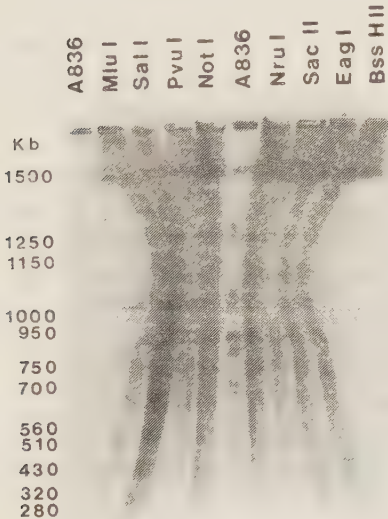


Abb. 11: Auftrennung von PC-3-DNA mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese (OFAGE)

Es wurden acht verschiedene Restriktionsnukleasen für die Einzelspaltungen eingesetzt. Die Größen der Hefechromosomen (Hefestamm A836; 4.8.2.) sind in kb angegeben. Das 1%ige Agarosegel lief 42 h bei einer Pulszeit von 100 s und einer Spannung von 270 Volt.

2.3.2.2. PFG-Analyse der W-Regionen: Amplicons in "Kopf-Kopf"- und "Schwanz-Schwanz"-Orientierung

Die von W. Lorenz und B. Straubinger durchgeführten Experimente zur Kartierung des K-Locus mit Hilfe der PFG zeigten, daß sich die W-Regionen auf anderen NotI-Fragmenten als die Anteile des K-Locus befinden (79). Zum K-Locus werden die V_K -Gene enthaltenden Regionen La, Lb (105), Aa, Ab (148), Oa, Ob (107) und B (80) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß Gene aus diesen Regionen an J_{KC_K} umgelagert werden (64, 67).

Eine erste eigene Versuchsreihe schloß sich an die Arbeiten von W. Lorenz und B. Straubinger an. In Abb. 12 sind die Resultate einer solchen Versuchsreihe dargestellt. PC-3-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsnukleasen gespalten (4.7.) und elektrophoretisch mit OFAGE aufgetrennt (4.8.2.). Anschließend wurde

die DNA auf Nylonmembranen transferiert und die Filter mit den angegebenen Proben hybridisiert (4.10.). Die Probe m607-3 (64) erkennt unter den angewendeten Hybridisierungsbedingungen (100 mM Phosphat, 68°C im letzten Waschschrift) alle bekannten V_K -Gene der Subgruppe II (A. Meindl, persönl. Mitteilungen), somit auch die entsprechenden Gene in Wa und Wb (Abb. 10). Das beobachtete Bandenmuster resultiert aus der Summe aller Restriktionsfragmente, die die V_K -Gene enthalten. Nach Abwaschen dieser Probe und Hybridisierung des Filters mit m5-5 (51), eines Klons, der nur Bereiche innerhalb des K-Locus erkennt (78), bleiben im Falle des NotI-Bandenmusters zwei Banden bei 1,05 Mb und 0,85 Mb (vormals als 1,3 Mb und 1,0 Mb bestimmt; 79) erhalten, welche die Anteile des K-Locus repräsentieren. Anschließende Hybridisierung des gleichen Filters mit dem für die W-Regionen spezifischen Klon m654-1 zeigt, daß dieser Klon nur die beiden NotI-Fragmente von 0,6 Mb und 0,25 Mb erkennt. Dieses Ergebnis konnte durch Versuche mit m177-1, der außer Wa und Wb auch die Region Wc erkennt (Abb. 9 und 10), bestätigt werden. Da in diesem Fall kein zusätzliches NotI-Fragment beobachtet wird, muß Wc auf einem der beiden NotI-Fragmente von 0,6 Mb oder 0,25 Mb lokalisiert sein.

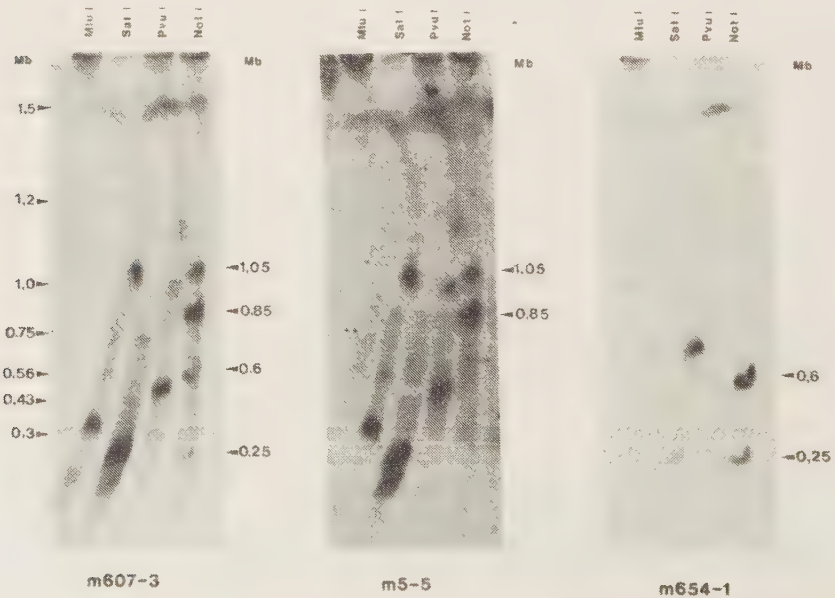


Abb. 12

2.3.2.2.1. Die W-Regionen als V_K -Gene enthaltende Amplicons in "Kopf-Kopf"- und "Schwanz-Schwanz"-Orientierung

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, konnten die W-Regionen auf zwei NotI-Fragmenten von 0,25 Mb und 0,6 Mb lokalisiert werden. Zunächst galt es, die verschiedenen W-Regionen jeweils einem der beiden NotI-Fragmente zuzuordnen. Dazu wurde PC-3-DNA mit NotI gespalten (4.7.), das Fragmentgemisch mit OFAGE aufgetrennt (4.8.2.) und die DNA der Größen 0,6 Mb, 0,4 Mb und 0,2 Mb aus dem Gel isoliert (4.8.3.). Anschließend wurde die isolierte DNA mit SphI nachgespalten (4.7.), elektrophoretisch aufgetrennt (4.8.1), auf Nylonmembranen transferiert (4.10.) und die Filter mit der Probe m654-1 hybridisiert (4.10.). Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 13 dargestellt. Das SphI-Fragment von

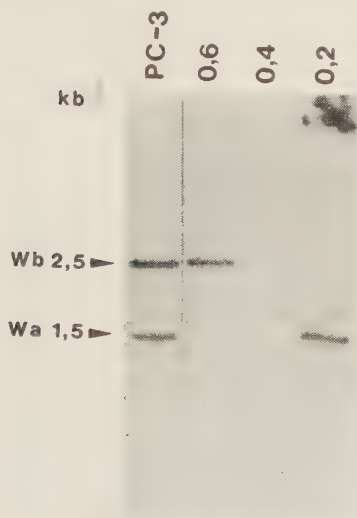


Abb. 13: Zuordnung der Regionen Wa und Wb zu NotI-Fragmenten von 0,25 Mb und 0,6 Mb

Die ungefähren Größen der isolierten und nachgespaltenen NotI-Fragmente sind in Mb oberhalb des Autoradiogramms angegeben. In SphI-gespaltener PC-3-DNA erkennt die Probe m654-1 ein Fragment von 1,5 kb, das aus der Wa-Region stammt, und ein Fragment von 2,5 kb, das die Wb-Region repräsentiert.

Die Fraktion der Größe von ca. 0,4 Mb stellt eine Negativkontrolle dar. Der Klon m654-1 sollte nicht mit Fragmenten aus dieser Größenfraktion hybridisieren.

Abb. 12: Die W-Regionen liegen auf anderen Restriktionsfragmenten als der K-Locus

PC-3-DNA wurde nach Spaltung mit vier verschiedenen Restriktionsnukleasen bei einer Pulszeit von 100 s und einer angelegten Spannung von 270 Volt 42 h mit OFAGE aufgetrennt. Die Größen der He-feschromosomen sind links neben dem Autoradiogramm in Mb angegeben. Die Größen der NotI-Fragmente sind jeweils gesondert rechts neben jedem Autoradiogramm aufgeführt.

1,5 kb, das durch Nachspaltung der DNA-Fraktion der Größe von 0,2 Mb erhalten wurde, ist charakteristisch für die Cosmide der Wa-Region, das Fragment von 2,5 kb, das durch Nachspaltung der DNA-Fraktion der Größe von 0,6 Mb erhalten wurde, ist in Cosmiden der Wb-Region vorhanden. Diese Resultate erlauben die Zuordnung von Wa zum 0,25 Mb NotI-Fragment und von Wb zum 0,6 Mb NotI-Fragment.

Als nächstes stellte sich die Frage nach der relativen Orientierung der W-Regionen zueinander, d.h. sind die Wa und Wb enthaltenden NotI-Fragmente von 0,25 und 0,6 Mb auf dem Chromosom benachbart oder nicht. Aus diesem Grund wurde versucht, die in PC-3-DNA gefundenen NotI-Stellen der 0,25 und 0,6 Mb großen Fragmente auf Cosmiden der W-Regionen zu lokalisieren. Das Auffinden einer solchen NotI-Stelle in einem Cosmidklon würde bedeuten, daß der entsprechende Klon ein Fragment enthält, das im Genom benachbarte NotI-Fragmente miteinander verbindet. Mit Suchklonen beiderseits dieser NotI-Stelle wäre man in der Lage, diejenigen NotI-Fragmente in Plazenta-DNA zu identifizieren, die in dem entsprechenden Cosmidklon über eine NotI-Stelle miteinander verbunden sind.

Kartierung von NotI in Cosmiden der W-Regionen zeigte, daß zwei verschiedene Gruppen von Klonen je eine NotI-Stelle enthalten (2.3.1.5.). Die Cosmide waren von H.-D. Pohlenz mit dem Klon m167-1 isoliert und Wa zugeordnet worden (106). Nachdem die NotI-Stelle der Wa-Region bei Kartenposition 126 kb (Abb. 10) lokalisiert werden konnte, wurde 3' davon ein Suchklon konstruiert; auf der 5'-Seite gab es bereits den Suchklon m654-1 (Abb. 10). Zur Konstruktion des 3'-gelegenen Klons wurde das 7 kb große ClaI/-SalI-Randfragment von cos171 in pBR322 kloniert (p171-4 in Abb. 10) und daraus verschiedene Fragmente in M13 subkloniert. Der für die Versuche verwendete Klon m171-3 enthält ein 0,8 kb großes BglII-Fragment (Abb. 10), kloniert in die BamHI-Stelle des Vektors M13mp10. Jetzt war es möglich durch PFG-Analysen und Hybridisierungen herauszufinden, welches NotI-Fragment sich 3' an das 0,25 Mb NotI-Fragment mit Wa anschließt.

Dazu wurde PC-3-DNA mit NotI gespalten, mit OFAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Das Ergebnis der Hybridisierungen dieses Filters mit den Proben m654-1 und m171-3 ist in Abb. 14 dargestellt. Der Klon m654-1 erkennt zwei NotI-Fragmente

von 600 kb und 250 kb mit Wb und Wa. Das Ergebnis der Hybridisierung mit m171-3 jedoch zeigt, daß dieser Klon das 250 kb NotI-Fragment nicht mehr erkennt. Dies ist aufgrund der Kartierungsdaten und der Lage des Klons zu erwarten (Abb. 10). Das einzige hybridisierende NotI-Fragment von 600 kb, welches die Wb-Kopie enthält, schließt somit in 3'-Richtung an das 250 kb NotI-Fragment

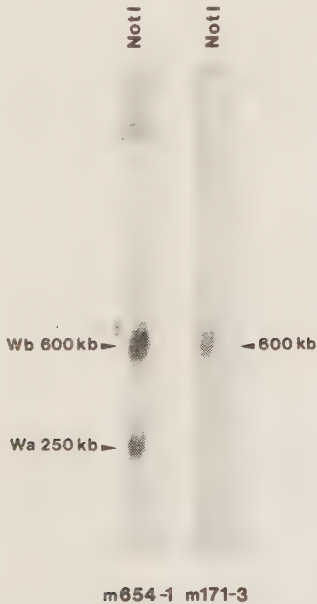


Abb. 14: Verknüpfen der beiden NotI-Fragmente von 250 kb und 600 kb durch Hybridisierungsversuche

Ein Filter, der mit OFAGE aufgetrennte, NotI-gespaltene PC-3-DNA enthält, wurde nacheinander mit den Proben m654-1 und m171-3 (Abb. 10) hybridisiert. Für die zweite Probe wurde sehr stringent nachgewaschen (10 mM Phosphat, 68°C). Das Fragment bei 600 kb enthält die Wb-Kopie, das 250 kb große Fragment den 5'-Bereich der Wa-Kopie (Abb. 10).

mit Wa an (Abb. 16). Die W-Regionen scheinen demnach als zusammenhängende, amplifizierte Einheiten auf dem langen Arm von Chromosom 2 vorzuliegen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird für die amplifizierten Abschnitte innerhalb der verschiedenen W-Regionen der Ausdruck "Amplicon" verwendet. Dieser Begriff wird unter anderem für amplifizierte Einheiten verwendet, die das Dihydrofolatreduktasegen (dhfr) enthalten (81).

2.3.2.2.2. Übersichtskartierung der W-Regionen mit Hilfe der Puls-Feld-Gelelektrophorese (OFAGE)

Da das Verknüpfen der verschiedenen W-Kopien bisher nur auf Versuchen mit der Restriktionsnuklease NotI beruht (2.3.2.2.1.), wurden weitere Nukleasen in Einzel- und Doppelspaltungen zur Kartierung verwendet. In Abb. 15 ist das Ergebnis eines solchen Versuchs dargestellt. Besonders hervorzuheben ist das Fragment von 200 kb in der NruI/NotI-Doppelspaltung. Dieses kommt dadurch zustande, daß bei einem Allel der Zelllinie PC-3 das 250 kb NotI-Fragment durch Spaltung an der NruI-Stelle bei 72 kb (Abb. 10) um 50 kb verkürzt wird. Dies gilt nicht für das zweite Allel von PC-3, welches die entsprechende NruI-Stelle nicht besitzt. Das 250 kb große NotI-Fragment bleibt in diesem Fall erhalten (Abb. 15). Es muß sich bei der NruI-Stelle an Position 72 kb (Abb. 10)

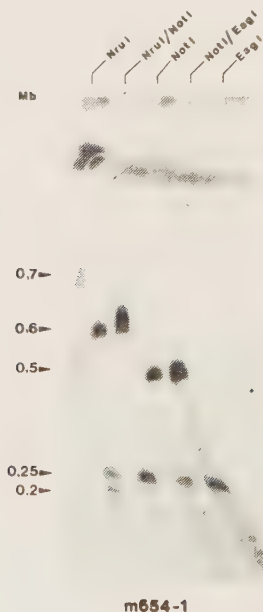


Abb. 15: Einzel- und Doppelspaltungen von PC-3-DNA mit selten-spaltenden Restriktionsnukleasen zur Kartierung der W-Regionen

Die verwendeten Restriktionsnukleasen sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben, die Größen der Banden in Mb links daneben. Zum Hybridisieren wurde m654-1 (Abb. 10) verwendet. Die zur Auftrennung verwendete Pulszeit betrug 45 s.

um eine polymorphe Spaltstelle innerhalb von Wa handeln, da Wa nur einmal pro haploidem Genom vorkommt (2.3.2.5.). Somit kann der Spaltstellenunterschied nicht durch das Vorhandensein ver-

Tabelle 2: Zusammenstellung der Hybridisierungsdaten, die bei der Kartierung der W-Regionen mit Hilfe der OFAGE erhalten wurden

Mit Subklonen hybridisierende Fragmente (Größen in kb)			
Spaltungen	m654-1	m177-1	m167-1
NotI	600, 250	600, 250	600, 400*, 250
NotI/PvuI	600, 250	600, 250	-
PvuI	1400	1400	1400
NruI	1200, 700, 500	1200, 700	1500*, 1200, 700
NruI/NotI	600, 250, 200	600, 250, 50	-
EagI	500, 250	500, 250, 100	-
EagI/SacII	500, 150	500, 150, 90	-
SacII	500, 150	500, 150, 90	-
SalI	700, 220	700, 650	-
BssHII	500, 250	-	-
MluI	1500	-	1500, 300*, 200*
SfiI	100-200	-	-

Fettgedruckte Angaben bedeuten, daß das Verknüpfen der Regionen Wa mit Wb und Wb mit Wc im wesentlichen auf diesen Daten beruht. Diese Fragmente werden durch Spaltungen an den Stellen erzeugt, die in Abb. 16 durch größere Buchstaben hervorgehoben sind. Ein Minuszeichen bedeutet, daß die entsprechenden Spaltungen mit dem jeweiligen Klon nicht analysiert wurden. Die mit * markierten Fragmente repräsentieren die Region Wx, die zusätzlich zu den Regionen Wa, Wb und Wc durch m167-1 (Abb. 10) erkannt wird (106).

Von besonderer Bedeutung sind die mit NruI erhaltenen Ergebnisse. Wie eben beschrieben, ist die Zelllinie PC-3 heterozygot bezüglich der NruI-Stelle bei Position 500 kb in Abb. 16. Dies erklärt die in Tabelle 2 aufgeführten NruI-Fragmente von 1200 kb, 700 kb und 500 kb mit m654-1. Das 1200 kb Fragment stammt von dem Allel ohne NruI-Stelle bei Position 500 kb (Abb. 16), die Fragmente von 500 und 700 kb stammen von dem zweiten Allel, welches die NruI-Stelle besitzt (Abb. 16). Die wichtige Schlußfolgerung daraus ist, daß die beiden kleineren NruI-Fragmente auf dem Chromosom benachbart sein müssen. Dies ist, neben der in 2.3.2.2.1. beschriebenen Verknüpfung der zwei NotI-Fragmente von 0,25 und 0,6 Mb, ein weiterer Beweis dafür, daß die W-Regionen als zusammenhängende, invertierte Amplicons im Genom vorliegen.

2.3.2.3. Die W-Regionen liegen auf dem langen Arm von Chromosom 2

Die bisherigen Daten erlaubten nicht die Beantwortung der Frage, ob sich die W-Regionen möglicherweise zwischen den beiden NotI-Fragmenten von 1,05 Mb (1,3 Mb) und 0,85 Mb (1,0 Mb), auf denen der K-Locus lokalisiert werden konnte (79), befinden. Dies wurde aufgrund der Inversion in Wb in einer früheren Arbeit als eine Denkmöglichkeit vorgeschlagen (79). Die Wb-Region würde in diesem Fall den Bereich des K-Locus repräsentieren, in dem die beiden duplizierten Blöcke des Locus in "Kopf-Kopf"-Orientierung verknüpft werden.

Zur Bestimmung der Lage der W-Regionen relativ zum K-Locus trugen die Analysen der Maus-Mensch-Hybridzelllinien RRP5-3 (135), JI4-2L und JI6-5 (31) bei. Die in diesen Zellen enthaltenen Anteile von Chromosom 2 sind aus Abb. 17 ersichtlich. Für die

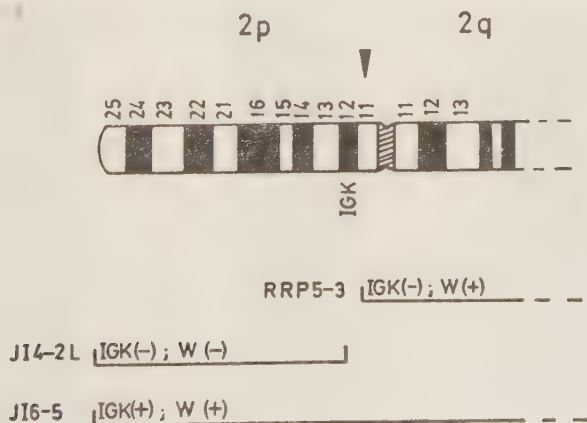


Abb. 17: Schematische Darstellung des kurzen Arms von Chromosom 2

Der Pfeil markiert den Abschnitt von Chromosom 2, in dem ein Bruch erfolgte, der zum Verlust von Teilen des kurzen Arms in der Zelllinie RRP5-3 führte (135). IGK gibt die Lage des Immunglobulin-K-Locus an. Das Zentromer ist schraffiert dargestellt. Die Anteile von Chromosom 2, die in den verwendeten Zelllinien RRP5-3 (135), JI4-2L und JI6-5 (31) noch vorhanden sind, sind durch Striche unterhalb des Chromosoms angegeben. IGK(-) bzw. W(+) bedeutet, daß in dieser Zelllinie der K-Locus nicht mehr vorhanden ist, jedoch die für die W-Regionen spezifische Probe m654-1 hybridisiert mit DNA dieser Zellen.

Hybridisierungsversuche wurden DNAs dieser Zelllinien freundlicherweise von G. Bruns, Boston, und H.-G. Klobeck, München, zur Verfügung gestellt. In Abb. 18 ist das Ergebnis von Hybridisierungen gespaltener, elektrophoretisch aufgetrennter und auf Nylonmembranen transferierter DNA dieser drei Zelllinien mit Klonen des K-Locus und der W-Regionen gezeigt. Die Proben m127-2 (51) und m144-2 (100) sind als Marker für den K-Locus zu betrachten, da sie ausschließlich Bereiche innerhalb der duplizierten L- (51) bzw. O-Regionen (100) erkennen. Der Verlust dieser Regionen in dem Hybrid RRP5-3 steht in Einklang mit dem Befund, daß diese Linie als Immunglobulin-Kappa negativ charakterisiert wurde (135). Die Probe m654-1 erkennt in RRP5-3-DNA zwei SphI-Fragmente von 1,5 kb und 2,5 kb; diese sind für die beiden Kopien Wa und Wb

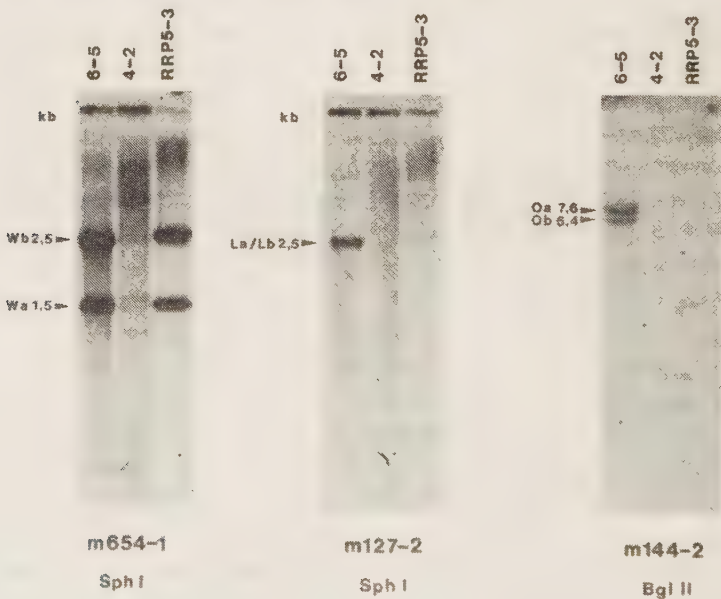


Abb. 18: Lokalisierung der W-Regionen durch die Analyse somatischer Zellhybride

Die analysierten Zelllinien sind oberhalb der Autoradiogramme angegeben. Die angegebenen Proben m654-1, m127-2 und m144-2 stammen aus den W-, L- (105) und O-Regionen (107) und hybridisieren mit den aufgeführten SphI- bzw. BglII-Fragmenten, deren Größen neben dem jeweiligen Autoradiogramm in kb angegeben sind.

charakteristisch (2.3.2.2.1.). Die Zelllinie JI4-2L entspricht der zu RRP5-3 nahezu komplementären Situation, da erstere den von C_K bis zum Telomer reichenden Anteil des kurzen Arms von Chromosom 2 besitzt, jedoch keine V_K -Gene (Abb. 17). Da JI4-2L mit keiner der verwendeten Proben positiv ist, befinden sich die L-, O- und W-Regionen ausschließlich 5' von C_K (d.h. Richtung Zentromer). Aus diesen Resultaten läßt sich weiterhin schließen, daß sich die W-Kopien nicht zwischen den beiden duplizierten Blöcken des K-Locus befinden können.

In situ-Hybridisierungen mit dem Klon m654-1, durchgeführt von H. Hameister, Universität Ulm, ließen eine genauere Lokalisierung der W-Regionen zu. Die Auswertung dieser Versuche erlaubte eine eindeutige Zuordnung der W-Regionen zum zentromernahen Bereich des langen Arms von Chromosom 2, zu der Bande 2q11 (H. Hameister, persönliche Mitteilungen). Da der K-Locus auf dem kurzen Arm in der Bande 2p12 lokalisiert wurde (83, 89), sind die W-Regionen, wie die Z-Familie (147), die Chr1- und Chr22-Region (76) als Orphons zu betrachten.

2.3.2.4. Bestimmung der Kopienzahl der W-Regionen im Genom relativ zu C_K

Wie aus Abb. 16 zu ersehen ist, wurden im zentralen Bereich des 600 kb NotI-Fragments keine Spaltstellen kartiert. Somit bestand die Möglichkeit, daß sich weitere W-Kopien in diesen Abschnitten befinden. Zur Bestimmung der Anzahl der W-Kopien im Genom wurde die in Abb. 19 gezeigte Probe konstruiert. Das Fragment 654-1 stammt aus der Wb-Region, innerhalb derer es an zwei Stellen hybridisiert; zusätzlich erkennt es die Wa-Kopie (Abb. 10). Das Fragment I-1 stammt aus der 5'-Flanke des einmal im Genom vorkommenden C_K -Segments (63) und erkennt ausschließlich diesen Bereich.

Hybridisierung von gespaltener Plazenta-DNA mit dem Konstrukt mI-1/654-1 (Abb. 19) sollte, bei geeigneter Wahl der Restriktionsnukleasen, zwei oder drei Banden nach Autoradiographie ergeben. Eine Bande wird durch die Hybridisierung des Fragments I-1 mit Plazenta-DNA erhalten. Das Fragment 654-1 sollte eine oder

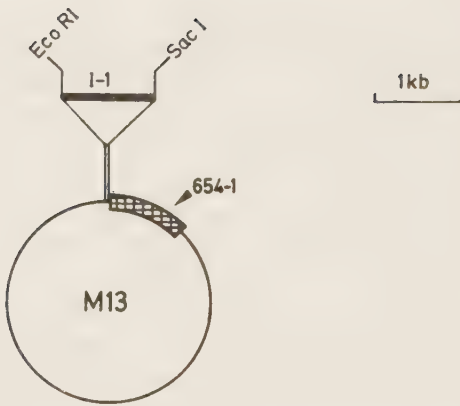


Abb. 19: Konstrukt zur Bestimmung der Kopienzahl der W-Regionen relativ zu C_K

In die EcoRI- und SacI-Stellen des Klon m654-1 wurde das 1,1 kb große EcoRI/SacI-Fragment aus pI-1 (63) ligiert. Das Fragment 654-1 ist schraffiert, das Fragment I-1 als ausgefüllter Balken dargestellt.

zwei Banden ergeben, je nachdem ob die verwendete Restriktionsnuklease Fragmente erzeugt, deren Größen in Wa und Wb identisch oder unterschiedlich für m654-1 sind. Das Ergebnis solcher Hybridisierungsversuche ist in Abb. 20 dargestellt. Die Spaltungen

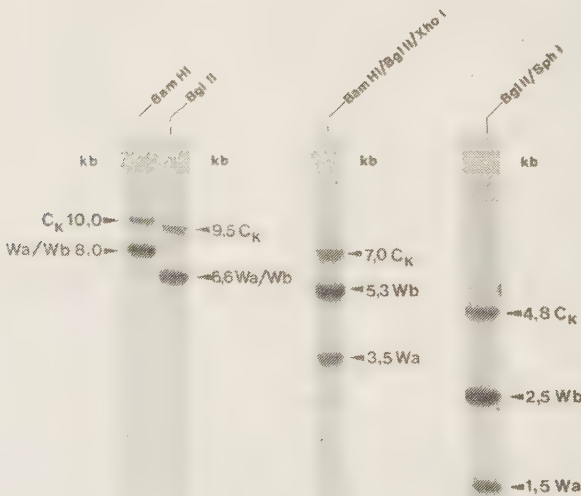


Abb. 20

sind so gewählt, daß die zu erwartenden Fragmente für die C_K - und W-Kopien in einem möglichst ähnlichen Größenbereich liegen. Dies ist wichtig, um eine annähernd gleiche Effizienz im Transfer der verschiedenen Fragmente aus dem Gel auf den Hybridisierungsfilter zu gewährleisten (A. Meindl, persönliche Mitteilungen). Nach erfolgter Autoradiographie konnten die erhaltenen Signale bestimmten Abschnitten des Hybridisierungsfilters zugeordnet werden. Die "Banden" wurden aus dem Filter ausgeschnitten und die Menge der daran gebundenen, radioaktiv markierten Probe durch Auszählung in einem Szintillationszähler bestimmt. Die so ermittelte Menge an gebundener Probe pro "Bande" ist ein Maß für die Anzahl der durch die Probe erkannten Kopien im Genom. Alle erhaltenen Zählwerte wurden auf denjenigen, den das Fragment I-1 ergab, bezogen. Dieses erkennt die nur einmal im Genom vorliegende Kopie von C_K (63). Somit sollten alle ausgezählten "Banden" mindestens diesen Wert ergeben. Für mehrfach im Genom vorkommende Kopien sollte das entsprechende Vielfache des Wertes für I-1 erhalten werden. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Das Ergebnis dieser Quantifizierungsversuche läßt den Schluß zu, daß keine weiteren mit m654-1 hybridisierende W-Kopien, außer den bekannten Wa- und Wb-Regionen, im Genom vorkommen. Die für Wb ermittelten zwei Kopien kommen dadurch zustande, daß das Fragment 654-1 an zwei Stellen innerhalb von Wb hybridisiert (Abb. 10).

Mit dem verwendeten Konstrukt mI-1/654-1 lassen sich "5'-verkürzte" Amplicons wie die Wc-Region (Abb. 10) nicht erfassen. Das Vorhandensein solcher "kurzen" Amplicons zwischen Wa und Wb bzw. Wb und Wc (Abb. 16) ist jedoch, wie in 3.4. noch diskutiert wird, unwahrscheinlich.

Abb. 20: Bestimmung der Anzahl der W-Kopien in Plazenta-DNA

Die Zuordnung der verschiedenen Regionen zu den entsprechenden Banden ist neben dem jeweiligen Autoradiogramm angegeben. Die mit C_K bezeichneten Signale resultieren aus der Hybridisierung des Fragments I-1 (63), die mit Wa und Wb bezeichneten Signale aus Hybridisierungen des Fragments 654-1 mit der gespaltenen Plazenta-DNA.

Tabelle 3: Quantitative Ermittlung der mit m654-1 hybridisierenden W-Kopien im Genom

Spaltung	Bandengröße in kb	Region	Zählwert ¹⁾ in cpm	Kopien ²⁾
BamHI	10,0	C _K	14 ± 10	1,0
	8,0	Wa/Wb	47 ± 9	3,5 (3-4)
BglII	9,5	C _K	21 ± 10	1,0
	6,6	Wa/Wb	58 ± 9	2,8 (3)
BamHI/BglII/	7,0	C _K	43 ± 7	1,0
XhoI	5,3	Wb	87 ± 7	2,0 (2)
	3,5	Wa	32 ± 8	0,7 (1)
BglII/SphI	4,8	C _K	40 ± 7	1,0
	2,5	Wb	80 ± 7	2,0 (2)
	1,5	Wa	35 ± 8	0,9 (1)

1) Von dem Zählwert der ausgeschnittenen "Bande" wurde der Leerwert abgezogen. Dieser ergibt sich aus der unspezifischen Bindung der Probe an den Hybridisierungsfilter und wurde durch Auszählen eines Filterstreifens, der oberhalb der jeweiligen Bande herausgeschnitten wurde, bestimmt. Die durch den Szintillationszähler ermittelten Standardabweichungen sind durch die $\pm$ -Werte angegeben.

2) Die angegebenen Werte ergeben sich aus dem Verhältnis der Zählwerte für die W-Kopien und der C_K-Kopie. In Klammern sind die daraus resultierenden W-Kopien relativ zu C_K angegeben.

Abb. 21: Subklonierung der Amplicongrenzen in der Wb-Region

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Restriktionskarte der Wb-Region. Amplifizierte Abschnitte sind durch dickere Striche dargestellt. Die konstruierten Plasmid- und M13-Klone sind unterhalb der Karte angegeben, sequenzierte Bereiche sind durch Pfeile gekennzeichnet. Durch gestrichelte Linien markierte Abschnitte wurden nicht sequenziert.

2.3.2.5. Alu-Elemente befinden sich an den Übergängen von amplifizierter DNA zu nicht-amplifizierter DNA

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, liegen die W-Regionen als zusammenhängende, invertierte Amplicons im Genom vor (Abb. 16).

Ein Vergleich der Restriktionskarten der verschiedenen W-Regionen untereinander zeigt, daß sich die 5'-Grenzen der amplifizierten Einheiten an unterschiedlichen Kartenpositionen befinden (Abb. 10). In den folgenden Kapiteln werden die Klonierungen und Sequenzanalysen dieser Amplicongrenzen beschrieben.

2.3.2.5.1. Klonierung und Sequenzanalyse der Amplicongrenzen in der Wb-Region

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, enthält Wb eine große invertierte Duplikation. Der Übergang des auf der 5'-Seite gelegenen Amplicons (enthält die Gene W11, W10 und W4) zu nicht-amplifizierter DNA befindet sich bei Kartenposition 45 kb, der des 3'-gelegenen Amplicons (enthält die Gene W7, W8 und W9) bei Position 57 kb. Die Strategie zur Klonierung der Übergänge zwischen amplifizierter zu nicht-amplifizierter DNA ist aus Abb. 21 ersichtlich.

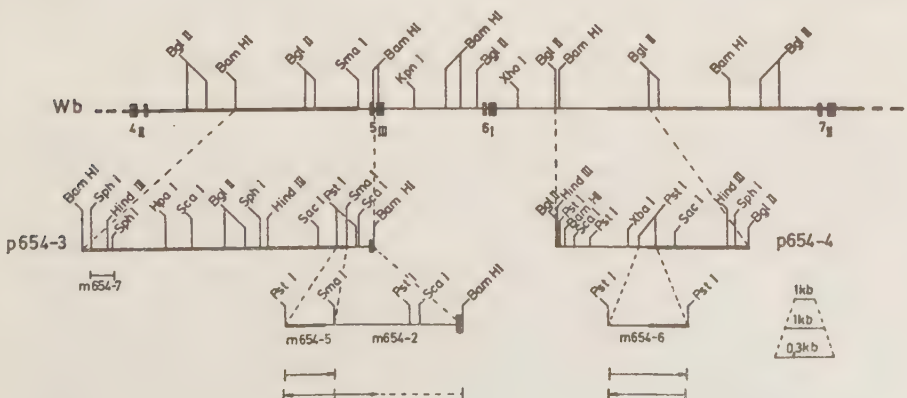


Abb. 21

Nachdem durch Feinkartierung der beiden Subklone p654-3 und p654-4 und Vergleich der beiden Feinkarten die Amplicongrenzen genau bestimmt waren, wurden die entsprechenden Fragmente zur Sequenzierung in M13-Vektoren subkloniert (Tabelle 4). Die Sequenzen der analysierten Abschnitte aus p654-3 (Klone m654-5 und -2) und p654-4 (Klon m654-6) sind in Abb. 22 gezeigt. Die Sequenzen sind so angeordnet, daß die 5'-Bereiche amplifizierter DNA entsprechen, die 3'-Bereiche nicht-amplifizierter DNA. Ein Pfeil markiert die Position, an der die Sequenzhomologie zwischen p654-3 und p654-4 abbricht.

M554-6 CTGCAGTGGGAAATGTACTCACCTTGAAGGCCAGCACCAGGAGGCAGACGAGCAGGGCCAGGAAGCGCATCTTGGAGGGTCCAGGAAAAATGCTGCTTC
 M554-5,-2 CTGCAGTGGGAAATGTACTCACCTTGAAGGCCAGCACCAGGAGGCAGACGAGCAGGGCCAGGAAGCGCATCTTGGAGGGTCCAGGAAAAATGCTGCTTC 100
 KonALUGGCTGGGCTGCTGGCTCACGCTTATCTCCAGCATTCTGGGAG

M554-6 TGGATCTAAGGCGGAGGAGAAATGTTGTTTGGGCTGGTCATTCAAGTCTGGGTTTCTCCAGAAGCGGGGCCAATAAGCAGAGTTTCTCTGGAGTTCGATTT
 M554-5,-2 TGGATCTAAGGCGGAGGAGAAATGTTGTTTGGGCTGGTCATTCAAGTCTGGGTTTCTCCAGAAGCGGGGCCAATAAGCAGAGTTTCTCTGGAGTTCGATTT 200
 KonALU GCCGAGGTGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACTGGTGAAACCCGCTCTCTACTAAAAATACAAAAATAGCGGGCGGT

M554-6 GCATGCTGATGACCTGAACAGAGCCCTATCCAGGGCTTCCCAGGGCAGGCAGGTCATTCTACCTTCAGCTGCCAGGAGGTGGTGGAGGTGATGTTG
 M554-5,-2 GCATGCTGATGACCTGAACCTCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATGGCGTGAACCGGGAGGCGAGCTGGCAGTGAAGCCAGATCGCGCCACT 300
 KonALU GGTGGCGCGCCCTGTAACTCCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATCGCTTGAACCCGGAGGTGGAGGTTGCACTGAGCCGAGATCGCGCCACT

M554-6 TGCCCTCAGGCTCATATGACTGAGGCTGGGCGAGCGGGGCCAGTGATGCTGCTGTGTCACAGGGCTCTCCCGCAGGGGCTGGGACAGAGGTACCCCA
 M554-5,-2 GCACCTCAGCTTGGGCGACAGAGCGAGACTCTGCCGCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAAGTGACAAATAAATGTAATGCACCTTGAATC 400
 KonALU GCACCTCAGGCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTC.....

M554-6 AGAACCCAGACAGATGTCTGCA
 M554-5,-2 ATCTGGAACCATCCCCACC 421
 KonALU

Abb. 22: Charakterisierung der Amplicongrenzen in Wb durch Sequenzanalysen

Die Sequenzen der analysierten Abschnitte aus den Klonen m654-6 (enthält die Grenze des 3' gelegenen Amplicons; Abb. 21), m654-5 und -2 (enthalten die Grenze des 5' gelegenen Amplicons; Abb. 21) und einer Konsensussequenz humaner Alu-Elemente (KonAlu; 61) sind gezeigt. Zwischen den Positionen 1 bis 55 und 338 bis 421 wurden nur die Sequenzen der Klone m654-6 und m654-5 bzw. -2 miteinander verglichen. In der Alu-Konsensussequenz erscheinen an diesen Positionen Punkte. Übereinstimmende Nukleotidpositionen zwischen zwei Sequenzen sind durch einen vertikalen Strich gekennzeichnet. Ein Pfeil markiert den Homologieabbruch zwischen den Sequenzen von m654-6 und m654-5. An dieser Position beginnt die Homologie zwischen der Sequenz von m654-5 und -2 und der Alu-Konsensussequenz. Eine Klammer markiert die gemeinsame SmaI-Stelle der Klone m654-5 und m654-2 (Abb. 21). Die A/T-reiche 3'-Region des Alu-Elements von m654-5 und -2 ist unterstrichen.

Tabelle 4: Subklone der W-Regionen, die für die Sequenzanalysen der Übergänge zwischen amplifizierter und nicht-amplifizierter DNA konstruiert wurden.

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragments		Fragment- länge (bp)	M13-Vektor
cos654	m654-5.1	PstI	SmaI	250	mp10
	m654-5.2	SmaI	PstI	250	mp11
	m654-2	SmaI	BamHI	700	mp11
	m654-6.1	PstI	PstI	400	mp11
	m654-6.2	PstI	PstI	400	mp10
	m654-7.1	SphI	SphI	530	mp18
	m654-7.2	SphI	SphI	530	mp18
cos165	m165-7.1	SphI	EcoRI	600	mp18
	m165-7.2	EcoRI	SphI	600	mp19

Subklone, die identische Fragmente aber in unterschiedlichen Orientierungen enthalten, sind mit .1 und .2 gekennzeichnet. Bei den unter der Spalte "Restriktionsenden des Fragments" angegebenen Restriktionsnukleasen gibt die erste Nuklease das 5'-Ende, die zweite Nuklease das 3'-Ende des Fragments an.

Computergestütztes Absuchen einer Datenbank, die 1.2 Mb an Humansequenzen enthält, nach Sequenzen, die zu den beiden analysierten Abschnitten aus p654-3 und p654-4 homolog sind, ergab, daß der sequenzierte Abschnitt von p654-3 (Klone m654-5 und -2) den 3'-Bereich eines Alu-Elements (61) enthält. Dabei ist bemerkenswert, daß die Homologie zu Alu-Elementen an der Position beginnt, an der sich der Übergang des 5'-gelegenen Amplicons zu nicht-amplifizierter DNA befindet (markiert durch einen Pfeil in Abb. 22). Dies entspricht der Kartenposition 45 kb in Abb. 10. In der Sequenz von m654-6 konnten keine Homologien zu Alu-Elementen gefunden werden (Abb. 22).

2.3.2.5.2. Klonierung und Sequenzanalyse einer Amplicongrenze in der Wa-Region

Zur Charakterisierung des Homologieabbruchs zwischen Wa und Wb wurde entsprechend der in 2.3.2.5.1. beschriebenen Strategie zur Klonierung der Amplicongrenzen in Wb verfahren. In Abb. 23 sind

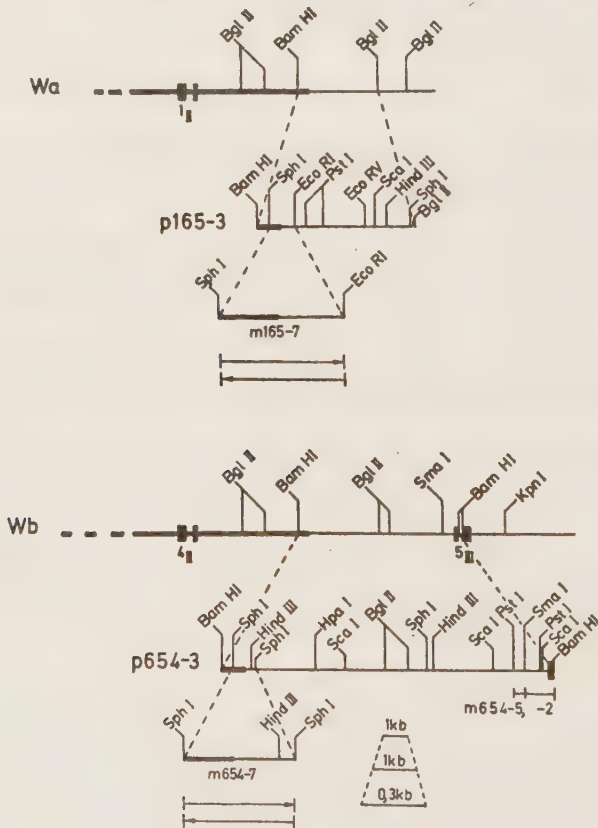


Abb. 23: Subklonierung der Regionen aus Wa und Wb, die einen Homologieabbruch enthalten

Gezeigt sind Ausschnitte aus den Restriktionskarten der Wa- und Wb-Regionen. Die verwendete Symbolik entspricht derjenigen aus Abb. 21. Die Karte von Wa ist im Vergleich zu derjenigen aus Abb. 10 um 180° gedreht, damit sich die homologen Bereiche der Subklone p165-3 und p654-3 auf der 5'-Seite befinden.

Jeweils diejenigen Abschnitte von Wa und Wb gezeigt, in denen die Homologie zwischen diesen beiden Regionen abbricht. Dabei wird die Restriktionskarte des Klons p165-3 aus Wa mit derjenigen des Klons p654-3 aus dem 5'-gelegenen Amplicon von Wb verglichen. Konstruierte Subklone zur genauen Lokalisierung des Homologieabbruchs durch Feinkartierung sowie Sequenzierklone sind unterhalb des jeweiligen Kartenausschnitts eingezeichnet.

Die Sequenzen der analysierten Subklone aus Wa und Wb sind im Vergleich zu einer Konsensussequenz humaner Alu-Elemente (61) in Abb. 24 gezeigt. Bemerkenswert ist, daß die Homologie zwischen

m165-7	GCATGCTCCAGTAAAGGAAGCTGTGCCTTGTGATTTTAAAGGCTGTTGGTGGCTGGGAGCAGTGGCTCAGCCTGTAATCCAGCACITTTGGGAGGCCG	
m654-7	GCATGCTCCAGTAAAGGAAGCTGTGCCTTGTGATTTTAAAGGCTGTTGGTGGCTGGGAGCAGTGGCTCAGCCTGTAATCCAGCACITTTGGGAGGCCA	100
KONALU	GGCTGGGCGTGGTGGCTCAGCCTGTAATCCAGCACITTTGGGAGGCCG	
m165-7	AGGCAAGTGCATCACTTGAGGCCAGGAGTTTGAGGCCAGCCTGGCCAACTGGTGAAATCCCGTCTCTACTAAAAATTCAAAAATTAGCCGGTCTTGGTG	
m654-7	AGGCAAGTGCATCACTTGAGGCCAGGAGTTTGAGGCCAGCCTGGCCAACTGGTGAAATCCCGTCTCTACTAAAAATTCAAAAATTAGCCGGTCTTGGTG	200
KONALU	AGGTTGGTGGTCACTCAGCTGAGCTCAGGAGTTTCAAGCAGCCTGGCCAACTGGTGAAATCCCGTCTCTACTAAAAATTCAAAAATTAGCCGGGCTGGTG	
m165-7	GTGGGTGCCTGTAGTCCAGCTACTTAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGTTTGAACCCAGGAGGTCAAGGTGCATTACAAGTTGCAGTTACATTTTT	
m654-7	GTGGGTGCCTGTAGTCCAGCTACTTAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGTTTGAACCCAGGAGGTCAAGGTGCAGTGAGCCAAAGATGGTGCACCTGTGC	300
KONALU	GGCGCGCCTGTAATCCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGTTTGAACCCGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAGATCGCGCACCTGCAC	
m165-7	TGACACTTTACAAATATTAGTCCACTGTCTTACTTACATTTATGATTATGATTGGAGCAGCTGTGTGCCTCTATTAAAGTGTCCCTCACAATG	
m654-7	TGACACTTTGAGGAGCAGAGCAAGCTTCTTCAAGATAAAAAATAAAATAATAATAAAAAATAAAAGGCTGTAGTAAACCTTTGGGT	400
KONALU	TCCAGCTTGGGCGACAGGAGGACTCCGCTC.....	
m165-7	AAACAGTTTATTTGGTGTCTTTAAGAGATTCTTCACTTTGGTGGTGGTTCAAACCTTAAATATCATATGAATCGGCCACCAAGACAGAGAAATA	
m654-7	TGTTAAACACATTGAAGTGTCTGGCAGGTGGCTGCTAGAGAGGACATGGAAGCTTGCACCATCTCACCCTGTCAACCTACCCGCTCATCTTGCCATA	500
KONALU		
m165-7	CTAAAAATCAGCAAATATATTGTTTGACATTCAA	
m654-7	TGCACTCTTCAGTTAGGCACCTCTCTGAGTTGCATGC	537
KONALU		

Abb. 24: Charakterisierung des Homologieabbruchs zwischen Wa und Wb durch Sequenzanalysen

Es sind die Sequenzen der Klone m165-7 (enthält die Amplicongrenze aus Wa), m654-7 (enthält den Homologieabbruch zwischen Wa und Wb) und einer Konsensussequenz humaner Alu-Elemente (KonAlu; 61) im Vergleich gezeigt. Die verwendete Symbolik entspricht derjenigen aus Abb. 22. Die Sequenzhomologie zwischen den amplifizierten Abschnitten von Wa und Wb bricht innerhalb eines Alu-Elements ab; dessen Sequenz ist der angegebenen Konsensussequenz zu 90 % homolog.

den Regionen Wa (m165-7) und Wb (m654-7) innerhalb eines Alu-Elements abbricht (an Position 224 der Konsensussequenz in Ref. 61). Dies entspricht der in 2.3.2.5.1. beschriebenen Situation, bei der sich der Übergang von amplifizierter zu nicht-amplifizierter DNA ebenfalls innerhalb eines Alu-Elements befindet (an Position 168 der Alu-Konsensussequenz in Ref. 61).

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Situationen, der Amplicongrenze innerhalb von Wb (Position 45 kb in Abb. 10) und derjenigen in Wa (Position 65 kb in Abb. 10), ist, daß im ersten Fall das Alu-Element nicht zum Amplicon gehört. Es stellt vielmehr den Beginn der dazu 3' gelegenen, nicht-amplifizierten Bereiche dar (Abb. 10 und 21). Im zweiten Fall befindet sich das Alu-Element innerhalb des amplifizierten Abschnitts von Wa. Die nicht-amplifizierte DNA beginnt mit einer Sequenz, die keinerlei Homologie zu den Sequenzen von Alu-Elementen zeigt (Abb. 10 und 23).

Auf die Bedeutung dieser Befunde für zu diskutierende Replikationsmechanismen, die möglicherweise an der Entstehung der verschiedenen W-Regionen beteiligt waren, wird in 3.6. ausführlich eingegangen.

2.3.2.6. Sequenzanalysen der V_K -Gene W4, W8 und W11

Wie aus Abb. 10 zu ersehen ist, enthalten die Regionen Wa und Wb insgesamt 11 V_K -Gene der Subgruppen I, II, und III. Die bis zum Beginn der eigenen Sequenzanalysen bereits sequenzierten Gene W1, W3, W6 (107), W2, W7, W10 (145), W8, W9 (52) und W5 (109) stellen Pseudogene dar. Da die W-Regionen als Orphons zu betrachten sind (2.3.2.3.), steht dies in Einklang mit dem Befund, daß alle bisher sequenzierten V_K -Gene transponierter Regionen Pseudogene sind (56, 76, 77, 147).

Die Sequenzanalysen der Gene W4 und W11 wurden aus zweierlei Gründen durchgeführt. Einerseits sollte geklärt werden, ob es sich bei diesen Genen, wie bei den übrigen Genen der W-Regionen, um Pseudogene handelt, andererseits sollten die Sequenzvergleiche der jeweils triplizierten Gene W11/W9/W3, W10/W8/W2 und W4/W7/W1 (Abb. 10) Rückschlüsse auf die Evolution der W-Regionen zulassen.

Eine Sequenzanalyse des Gens W8 wurde bereits durch C. Huber durchgeführt (52). Der Sequenzvergleich der Gene W10/W8/W2 ergab, daß sich W8 an mehreren Positionen von dem Gen W10 unterscheidet (145). Da sich diese Sequenzunterschiede nur unter der Annahme erklären lassen, daß ausschließlich das Gen W8 und nicht auch W10 im Verlauf der Evolution mutiert ist (145), wurde die Sequenz von W8 aus einem anderen Cosmidklon (cos170) im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu bestimmt.

2.3.2.6.1. Klonierung und Sequenzierung der Gene W4, W8 und W11

Die Strategien zur Sequenzierung der Gene W4, W8 und W11 sind aus Abb. 25 ersichtlich. Zur Konstruktion der W4-Subklone wurde nach BglIII/PvuI-Doppelspaltung des Cosmidklons cos196 und präparativer Elektrophorese ein 7 kb großes Fragment isoliert. Durch Nachspaltungen dieses Fragments mit geeigneten Restriktionsnukleasen und Ligierung der erzeugten Fragmente in M13-Vektoren wurden die in Abb. 25 eingezeichneten und in Tabelle 5 aufgelisteten m196-Subklone erhalten. Zur Konstruktion der W8- bzw. W11-Subklone wurde analog den W4-Subklonierungen vorgegangen. Die W8-Klone wurden ausgehend von cos170, die W11-Klone aus cos755 konstruiert. Die Sequenzierungsstrategien für die Gene W4, W8 und W11 sind Abb. 25 zu entnehmen. Eine Zusammenstellung sequenzierter M13-Subklone der Genregionen W4, W8 und W11 befindet sich in Tabelle 5.

Die Nukleotidsequenzen von W4, W8 und W11 mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Abb. 26 gezeigt. Die drei Gene sind Pseudogene. Sie besitzen neben einer Reihe ausgetauschter invarianter Aminosäuren (59) jeweils ein Stoppcodon. Die Gene W4 und W8 enthalten zusätzlich Insertionen und Deletionen, die Rasterverschiebungen zur Folge haben. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Sequenz des Gens W8 unterscheidet sich an acht Positionen von derjenigen, die C. Huber aus cos166 ermittelte (52). Möglicherweise handelt es sich um zwei stark divergente Allele des Gens W8. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche der Gene W4, W8 und W11 mit W1/W7, W2/W10 bzw. W3/W9 werden in 3.5. diskutiert.

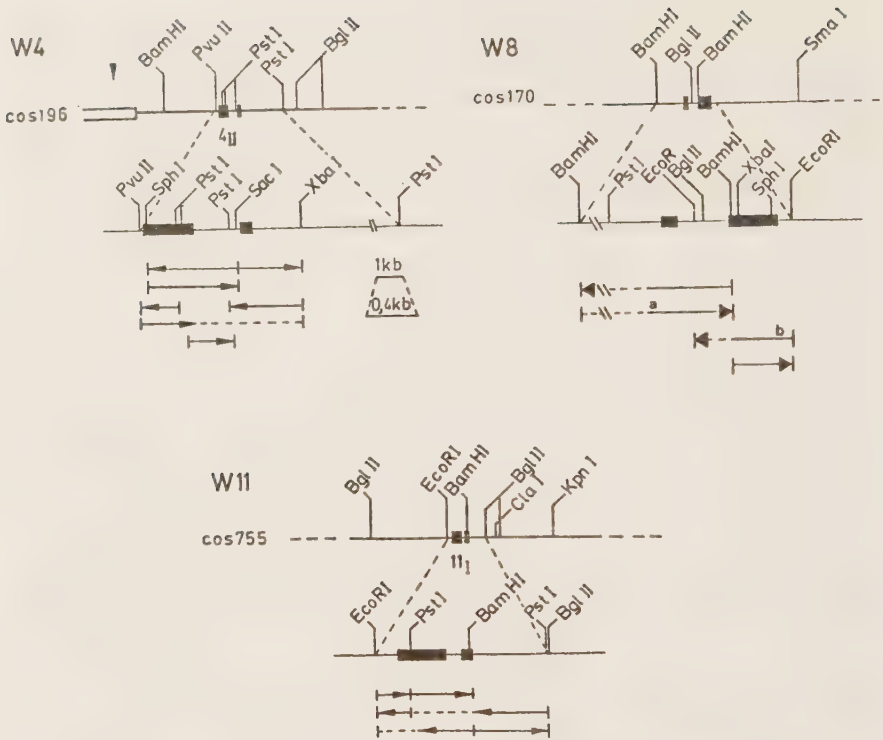


Abb. 25: Klonierungs- und Sequenzierungsstrategien zur Analyse der Gene W4, W8 und W11

Gezeigt sind diejenigen Abschnitte von cos196, cos170 und cos755, die die Gene W4 ($V_{K,II}$), W8 ($V_{K,II}$) und W11 ($V_{K,I}$) enthalten. Die verwendete Symbolik entspricht derjenigen von Abb. 21. Die PvuI-Stelle des Vektors pHc79 ist in cos196 durch ein ausgefülltes Dreieck gekennzeichnet. Zur Sequenzierung der W8-Subklone wurden zum Teil synthetische Oligonukleotidsäuren verwendet; deren Lage ist in der Sequenzierungsstrategie durch a bzw. b gekennzeichnet. Fragmente mit dem Symbol ---//--- sind nicht in ihrer vollen Länge eingezeichnet.

Tabelle 5: Konstruierte Subklone für die Sequenzanalysen der Gene W4, W8 und W11

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragments		Fragment- länge (bp)	M13-Vektor
cos170	m170-2.1	BamHI	BamHI	1500	mp10
	m170-2.2	BamHI	BamHI	1500	mp10
	m170-3	EcoRI	EcoRI	700	mp10
	m170-4	BamHI	EcoRI	450	mp10
cos196	m196-2	SacI	XbaI	450	mp11
	m196-3	XbaI	PstI	500	mp11
	m196-4	PstI	PvuII	300	mp10
	m196-5	PvuII	XbaI	1250	mp11
	m196-6.1	SacI	SphI	600	mp19
	m196-6.2	SphI	SacI	600	mp18
	m196-7	PstI	PstI	340	mp11
cos755	m755-1	PstI	PstI	1000	mp11
	m755-2.1	EcoRI	PstI	300	mp11
	m755-2.2	PstI	EcoRI	300	mp10
	m755-3	BamHI	EcoRI	700	mp10
	m755-4	BamHI	PstI	600	mp11
	m755-5	PstI	BamHI	410	mp10

Die verwendete Nomenklatur entspricht derjenigen von Tabelle 4.

Abb. 26a

W4

CGAACTTAACCTTGCTAAGGAGAAGTGAGAAAGTACCTGGGAATCTAAGTAACGAGAAATCTAAGAGAGAAGACAAAGAGAAAGGGAATTTATCC -676

TACTCATGCAGCAGCAGATTATCTCTATTGGTTTCTCTCTAAACAGAGACAATATTAAAGTCATTTGGCCCTCAAGAGAGGCTCCACCATCCCTTGG -576

CYCTTTCCACCCCACTGCACCCACTCAGGGGATTTGCATATTGTCCCTAGGGAGGACCTTCCATTGTGAGTCTGAGATAAAGCTCCAGCTCTAACCTTG -476

IL' FR1
CCTTGACTGATCAGGACTCCTCAGGACCTCTCAGAGTCCCTGCTCAGCTCTCTGGGCTGCTAATGCT.CGGGTCCCCGTAAGGACAGCAG -376

GGAGATGAGGAGGAGAAATGGGTTGGAGGTGAGCTCTGGGGCCCAATGTCTCCATGTGTGTTCAGTCCAGCTGTAGATATGAGCTCTTTTCTG -276

CAGCATGAGGCATATGATGTACTGATCTCTGAGAGGAGGAAGATTTTAGAAGGAAGGATATGTGCCCTGAAGAAACAAGCTTTAGAAAGAGGATGAT -176

GGATGGGAGACCATTGTGCTTGCATCTGTTGAGTCTTTTGAATTTGATATTCCTGAAATGCAAGAATATATACAGGCTGAAATAATAAATG -76

IL' FR1
GAAATATGAACATGATGCACAATATTGTACATAACTTGGCCCTTTCTGTCATCATTCAGGATCTAGTGGGACATCTGTTGACCCAGACTCCAC -9

CDR1 27 A B C D E FR2
EUSERLEUSERILETHRPROGLYGLUPROALASERILESERCYARGSERARGSERLEULEHISERASNGLYASNTHRTYRLEUHIHIS*LE 37

TCCTCTGTCCATCACCCTCCAGAGCCGCTCCATCTCTCTCAGGTCTAGTCGAGCTCTGTCATAGTATGGAACACCTATTATACATTGGTAGCT 125

CDR2 FR3
UGLNLVSPROGLYGLNPROBGLNLYLEULECYSLYSVALSERASNARGPHESEGLYVALPROASPARGPHESEGLYSEGLYSEGLYILEASP 70

GCAGAAAGCCAGGCCAGCTCCACAGTGTCTAATCTGCAAGGTTTCTAACGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAAGTGGCTGGGCTGGGCTATTGAT 225

CDR3
PHETHRLEULYSLERSEPROVALGLUALAALASPVALGLYVALTYRTHRCYSMETGLNALATHRHIS*TRPSE 95

TTACACTGAAATCAGCCCGGTGGAGGCTGCGGATGTTGGGTTTATATTACTGCATGCAAGCTACACACTGTTGCCCCACAGTGCTACATCTCGGAAC 325

AGAAACCTCTCTGCTGG 342

Abb. 26b

W8

CTAGTGTGTCCTCCTCAACTACTACAGGCATACTTGACTGAACTATGTTGTTTGCTCCATTGAACATTTTATGTACATTGTTCAGTAGAGAC -575

ATACCCCTCCACACTGACCCCTTCCACACTGCTGCACCCACAGGTGATTGCTATTTGCAACCTTAGGGAGGACCTTCCCTTGTGAGTCTGAGGTA -475

IL' FR1
AAGCTCAGCTCTAACCTTGCTCGACAGATCAGGACTCCTCAGTCCATCTCACATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCTCTGGGCGGCTAATGCTCAAGATA -9

GLUYSILE*G
GAAATATATCAGGTGGGAAATGGGTTGGAAGGTGAGTCTGGGAGCTCCATAGCTTCCATATTATTATCAACCATGTGTAGAGGCACATGGTCTA -275

TGCTCCAGGAAGAGAATTCATATTTTGTCTTAAGAATAATCAGGATTCACCTCCAAGGAACAATGACCTCTGATTAAGATCTTGAATAAAGAGTTC -175

CCTGCTGGCTGTAATAATAGGGTTCATTTTGAAGTCTACTTTTCCATGATATAAATCAAACTTGAAATATATGTAAGTGAATCATGATCATAGA -75

IL' FR1
GAAATCATGAAAGTGTCTAATGTGTCTATACAACTTGCACCTTCTCTGTATTATTTCAGATCCAGTGGTGATAGTGTGAGTCCAGCTCCACT 9

CDR1 27 A B C D E FR2
USER---ALAPHEALASERARGGLUPROPRO---ILESERCYARGSERSEGLNLERLEULEUSERSERASNPGLYPHESERTYRSERTYRTRPHELE 37

CTCC.TGGCTGTGGCTGTGAGAGAGCCACCC.CCATATCTGTAGTCTAGTCAGGCTCTGTGTCAGTATGATGATTTCTCTATTGCTATTGGTTCT 126

CDR2 FR3
UGLNLVSPROGLYGLNPSERPROGLNLEULEULETYRPHVALSERASNARGALASERGLYVALPROASPARGPHEASNGLYSEGLYSEGLYTHRASP 70

GCAGAGCCAGGSCAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTITGTTTCAACCGGGCTCTGGAGTCCAGACAGGTTCAATGGAGTGGTCAAGGCACTGAT 226

CDR3
PHETHRLEULYSLERSEPROVALGLU---GLUASPVVALGLYVALTYRTHRCYSMETGLNALALEUENLEUPRO 95

TTACACTGAAATCAGCCCGGTGGAG.CTGAAGATGTTGGGTTTATATTACTGCATGAGGCTCTGAGCTTCTCCACAGTGATACAGCCCCATAGAG 326

AAACCTCCCTTCTGGGTTGCTCCAGCTGCTCATGACTGCTGTGTCTGGGAGCAGCTCAGCAGGCTCTCTGCTGTCAGAAAGAGAGGCTGTGGGA 424

Abb. 26c:

W11

GACACTGCCCTTTGCTGAGTTACCGAGATGAGCCAGCCCGGCTGGCTGTGCCAGCCTGCCCTCCCTCGTATTTGTGTGCTCTAGAGCGCAGCCCC -259

CTGCCCTGAAGACTTCTTAATAGCGTGGTCAACCCGTGCGAGGAGTCAGTTGCAGTCAGGACACAACTGAACATGAGGATCCCCGCTCAGCTCTGGC -12

APHELEULEULEUCYSLEUPROA -159

AACATGCTGAANAAGTGTAATATTTGTATTTTCAACCTGAGATGCCAGATGTGACATCAGATGACTCAGCCTCCATCTCCCTGCTGCATCT -4

SPALAARGCYASPILEGNNMETTHRGNNPROPSERLEUSERLASER -59

AACATGCTGAANAAGTGTAATATTTGTATTTTCAACCTGAGATGCCAGATGTGACATCAGATGACTCAGCCTCCATCTCCCTGCTGCATCT 14

CDR1 FR1 FR2 42

VALGLYASPARGALATHRVALSERCYSGNLALASERGLNSERILETYRASNTYRLEUASNTIPTYRGLNGLNLYSPROGLYLYSALAPROLYSPHELEUT 148

GATGAGACACAGCCACGCTCTCTTCCAGGCTAGTCAAGCATTTACAACATTTAAATTTGATCAGCAGAAACAGGGAAAGCACCCTAAGTTCTCTGA 142

CDR2 FR3 81

HRTYRARGALASERLEUGLNARGALAMETPROSERGLNPHESEGLYSEGLYTYRGLYARGASPPHETHRLEUTHRVALSERLEUGLNPROGL 242

CDR3 95

UASPPHEALATHRTYR * CYSGNLNGLUSERILEPHEPRO 342

AGATTTTCCAACTTATTAATGTCAACAAGAGAGCATTTTCCCTCCCGCAGTGTGACAAGTCATAACATCAACTGCTAGGATAGCAGATGAGTGAGGCCGG

GTGTCCTAGATGCCCTCTCTAGTGCTCAATCTGCTGAGTTGTTTCCAGATGCAGCCAAAGTTTGAAGTGCTGTGAAATTTTGTGAAATTTGTGATG 442

AGGTGGCTCCTTTTGACCCCACTCTCTTCTCTCTCACTCCCGAAGCAAGACATGAAATGGGAGCTCTGATTTAATAAAGAGATTAAACCACTGAGGA 542

GTCTGTTATGGGATGATTG 561

Abb. 26: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der Gene W4, W8 und W11

In der gezeigten Darstellung sind die regulatorisch wichtigen pd- und dc-Sequenzen (32), die TATA-Box (12) und die V-J-Umlagerungssequenzen (15) unterstrichen. Die Grenzen der kodierenden Regionen wurden durch Vergleich mit veröffentlichten Aminosäuresequenzen (59) und unter Berücksichtigung der Exon-Intron-Spleißregeln (12) festgelegt. Die formalen Translationsprodukte sind über den Nukleotidsequenzen dargestellt. Die nach Kabat et al. invarianten, Subgruppen-spezifischen Aminosäuren (59) sind unterstrichen. Austausche an diesen Positionen sind durch Striche oberhalb der jeweiligen Aminosäure gekennzeichnet. Stoppcodons sind als * markiert, Deletionen sind als Punkte in der Sequenz dargestellt. Auf eine Insertion in W4 bzw. W8 wird jeweils durch ein ausgefülltes Dreieck hingewiesen. In W8 ist die Donorspleißstelle am 3' Ende der L-Sequenz deletiert. Die Aminosäuren bis zu einer alternativen Spleißstelle sind durch eine unterbrochene Linie unterstrichen. Innerhalb der translatierten Bereiche sind verschiedene Subfragmente gekennzeichnet: L, L' = Signalpeptid; FR1, 2, 3 = "framework-regions"; CDR1, 2, 3 = "complementarity determining regions". Die Nukleotid- und Aminosäurepositionen sind am Rand angegeben. Position 1 für beide Zählweisen ist der Beginn der FR1-Region.

Wie im folgenden Kapitel noch ausführlicher erläutert wird, zeigt der das Gen Chr22-5 enthaltende Abschnitt Ähnlichkeiten in der Spaltstellenabfolge zu einer Gruppe von Orphonregionen, die ebenfalls ein V_K -Gen der Subgruppe I enthalten. Da diese Homologie möglicherweise auf eine gemeinsame Entstehungsgeschichte dieser verschiedenen Regionen schließen läßt, wurden einige Fragmente aus der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 subkloniert und durch Sequenzanalysen näher charakterisiert.

2.4.1. Die Chr22-5-Genregion ist homolog zu anderen V_K I-Orphonregionen

Ein Vergleich der Restriktionskarte der Genregion Chr22-5 mit den Karten anderer transponierter V_K I-Gene zeigt, daß die verschiedenen Regionen zueinander homologe Bereiche enthalten (Abb. 28). Insbesondere die 5'-Flanken der vier Genregionen Chr22-5, Z1, Chr1 und cos118 zeigen eine auffallende Ähnlichkeit in der Spaltstellenabfolge, welche sich nur zum Teil in den 3'-Flanken fortsetzt. Sequenzvergleiche dieser vier Gene untereinander ergeben, daß die durchschnittliche Homologie zwischen den analysierten Bereichen 97,5% beträgt (75). Eine ähnlich hohe Homologie zeigen lediglich allelische bzw. duplizierte V_K -Gene (104). Innerhalb der Subgruppe I sind verschiedene Mitglieder durchschnittlich zu 90% homolog (56). Aufgrund der sehr hohen Homologie von 97,5% zwischen verschiedenen V_K I-Orphons kann der Schluß gezogen werden, daß diese Gruppe von Genen möglicherweise durch Amplifikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden ist.

Amplifikationsmechanismen, bei denen RNA-Zwischenprodukte involviert sind scheiden aus, da alle untersuchten Orphongene sowohl die Intronsequenzen als auch die 5'- und 3'-regulatorischen Sequenzen enthalten (77, 147). Ein Mechanismus, bei dem nur DNA-Zwischenstufen auftreten, ist die sogenannte Überreplikation (11, 115, 123). Dabei werden die amplifzierten Einheiten durch mehrmalige Initiation der DNA-Replikation an einem Replikationsursprung innerhalb eines Zellzyklus erzeugt. Der Replikationsursprung sollte nach diesem Modell in den entstandenen Amplicons vorhanden sein.

zellulären Transformationssystem (49) getestet wurden. Zum damaligen Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, daß mit diesem Testsystem beliebige Fragmente auf das Vorhandensein von ARS-Elementen (autonomously replicating sequences) hin untersucht werden können (49). Wie die Ergebnisse späterer Versuche zeigten, stimmten jedoch die Voraussetzungen, unter denen man mit dem Testsystem eine sichere Aussage über das Vorhandensein von ARS-Elementen machen könnte, nicht. Die zur Klärung der Situation beitragenden Versuche wurden in unserem Labor von R. Mocikat (zitiert in Ref. 75) und von F. Grummt in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen ausgeführt (38, 154, 156). Zu dem Zeitpunkt, an dem die eigenen Versuche durchgeführt wurden, standen die entsprechenden Ergebnisse noch nicht zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Fragmente aus der 5'-Flanke von Chr22-5 mit dem zellulären Testsystem (49) analysiert. In Abb. 27 sind die aus cos218 konstruierten Subklone eingezeichnet. Weiterhin wurden aus cos206, welches eine allelische Variante von cos218 darstellt (Abb. 27), die Subklone p206-1 bis 3 konstruiert (Tabelle 6). Parallel dazu hat E. Löttscher aus unserer Arbeitsgruppe Subklone aus den 5'-Flanken der V_K I-Gene der Chr1- bzw. der Z1-Region für den selben Zweck konstruiert (74). Die Klonierungsversuche wurden gemeinsam mit den Ergebnissen der Transformationsexperimente veröffentlicht und zwar nachdem es klar war, daß es sich bei den gesuchten Sequenzen nicht um ARS-Elemente handelt (75). In den folgenden Kapiteln werden nur die eigenen Versuche beschrieben sowie die Ergebnisse der Transformationsversuche mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Subklonen.

2.4.2. Suche nach konservierten, Amplifikationen fördernden Sequenzelementen in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5

Das Prinzip des verwendeten Testsystems zur Analyse der Fragmente aus den 5'-Flanken der Gene Chr22-5 aus cos206 und cos218 ist ausführlich in Ref. 49 beschrieben. In Kürze: der verwendete Vektor ptk enthält als Selektionsmarker das Thymidinkinasegen (tk) des Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1). Der Promotor dieses Gens ist

im Vektor ptk derart verkürzt, daß nur noch maximal 5% der ursprünglichen Transkriptionsrate erreicht werden können (90). Die mit dem Vektor transfizierten Ltk⁻-Mauszellen, die selbst kein tk enthalten, sterben unter HAT-Selektion (149) ab, da sie nicht genügende Mengen an Thymidinkinase (TK) produzieren können. Enthalten die zu testenden Fragmente jedoch Sequenzen, die zu einer Erhöhung der Zahl der ptk-Kopien pro Zelle führen, können die entsprechenden Klone in HAT-Medium überleben. Die verringerte Transkriptionsrate des einzelnen tk-Gens kann durch eine erhöhte Kopienzahl kompensiert werden (Gendosiseffekt). Um auszuschließen, daß die mit dem Testsystem selektionierten Fragmente als Transkriptionenhancer wirken, wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Grummt entsprechende Kontrollversuche durchgeführt (49).

Die Ergebnisse des in vivo-Replikationstests mit den Fragmenten aus der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, sind von den sieben getesteten Fragmenten aus der 5'-Flanke von Chr22-5 (p206-1 bis 3 und p218-1 bis 4) sechs positiv im Test. Der Klon p218-4 ergibt die gleiche Anzahl an tk⁺-Klonen wie die Negativkontrolle, das Plasmid ptk ohne Fremdsequenzen; p218-4 wird somit nicht als positiv gewertet. Die mit dem reinen Vektor erhaltenen tk⁺-Klone können durch chromosomale Integration des Plasmids erklärt werden. Benachbarte Promotor- oder Enhancer-Elemente könnten den schwachen tk⁺-Promotor des Plasmids ptk kompensieren. Eine zweite Negativkontrolle, ein Fragment aus der 5'-Flanke des V_KI-Gens O9 (p146-3), erzeugt keine stabilen Klone. Dies zeigt, daß nicht jede beliebige 5'-Flanke von V_KI-Genen Sequenzelemente enthält, die in dem verwendeten Testsystem Ltk⁻-Zellen zum tk⁺-Phänotyp transformieren können.

Tabelle 6: Zusammenstellung der in einem zellulären Transformations-test analysierten Klone und der ermittelten Aktivitäten

Plasmide ^{a)}	Fragment- ^{b)} länge (bp)	Klonierungs- ^{c)} stelle in ptk	tk ⁺ -Klone ^{d)} pro Platte	Kopien ^{e)} pro Zelle
p206-1	3700	BamHI	8,5(102/12)	250±220(9)
p206-2	800	BamHI	7,4(89/12)	200± 80(5)
p206-3	2900	BamHI	3,1(37/12)	80± 30(8)
p218-1	3700	BamHI	8,4(152/18)	170± 70(12)
p218-2	838	BamHI	5,1(92/18)	180±160(9)
p218-3	1100	BamHI	1,3(23/18)	150±110(4)
p218-4	1800	BamHI	0,5(9/18)	80± 50(2)
p115-29.1	17	ClaI	0,5(3/ 6)	nd
p115-29.2	4x17	ClaI	4,5(27/ 6)	nd
p115-30.1	12	HindIII	2,0(12/ 6)	nd
p115-30.2	2x12	HindIII	3,2(19/ 6)	nd
p115-31	13	ClaI/HindIII	0,8(5/ 6)	nd
ptk	--	--	0,6(7/12)	nd
p146-3	2700	BamHI	0,0(0/ 9)	nd

a) Die Bezeichnungen der Plasmide entsprechen denjenigen in Abb. 27 und 29. Die Klone p206-1 bis 3 stellen allelische Varianten von p218-1 bis 4 dar. Da die BamHI-Stelle, markiert durch ein Dreieck in Abb. 27, in cos206 nicht vorhanden ist, entspricht der Klon p206-3 den beiden Klonen p218-3 und 4. Die mit 29.2 und 30.2 bezeichneten Klone enthalten vier bis fünf bzw. zwei bis drei Kopien der Oligodesoxyribonukleotide aus p115-29.1 (5'-CTCCTGAGACC-CCAGGA-3'; CTC-Element) und p115-30.1 (5'-TGAAATAATGAG-3'; NFIII-Element); p115-31 enthält die Sequenz 5'-AGGAGAGAGGCTC-3', welche die 3'-5'-Version eines CTC-Elements darstellt. Der Klon p146-3 enthält ein 2,7 kb BamHI-Fragment mit dem Gen 09 und 2,2 kb aus dessen 5'-Flanke (107).

- b) Die Längen der Fragmente wurden entweder durch Spaltungen mit Restriktionsnukleasen oder durch Sequenzierung bestimmt. Die synthetischen Desoxyribonukleotide in den Klonen p115-29.1 bis 31 enthalten an ihren Enden zusätzlich zu den Sequenzen aus cos115 (Abb. 30) ClaI- bzw. HindIII-Restriktionsspaltstellen.
- c) Bei zwei angegebenen Klonierungsstellen entspricht die erste Spaltstelle dem 5'-Ende, die zweite Spaltstelle dem 3'-Ende des Fragments.
- d) Die Gesamtzahl der erhaltenen Klone und ausgewerteten Platten ist in Klammern angegeben.
- e) Die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Anzahl der Kopienbestimmungen, letztere in Klammern, sind aufgelistet. Die Angabe nd bedeutet, daß die entsprechenden Werte für den jeweiligen Klon nicht ermittelt wurden.

2.4.3. Zwei konservierte Sequenzelemente in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 sind positiv in einem zellulären Transformationstest

Mit dem in 2.4.1. beschriebenen zellulären Transformationstest konnten Sequenzelemente im Mausgenom identifiziert werden, die man für muARS-Elemente (murine autonomously replicating sequences) hielt (49). Durch Sequenzanalysen der Fragmente 218-2 und 3, die positiv in dem Transformationstest waren (Tabelle 6), sollte herausgefunden werden, ob diese Bereiche zu den sogenannten muARS-Elementen verwandte Sequenzen enthalten. Die sequenzierten Abschnitte sind Abb. 29 zu entnehmen, die Sequenzierklone sind in Tabelle 7 aufgelistet.

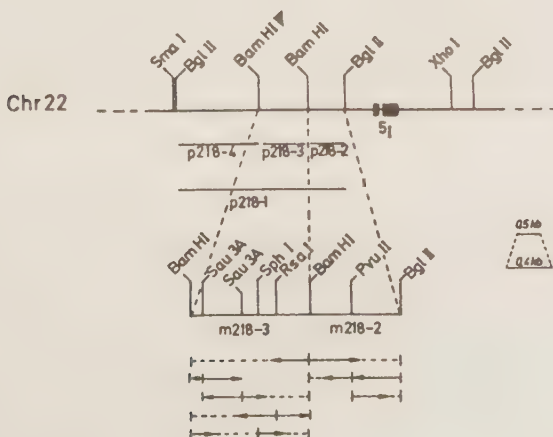
Abb. 29: Subklonierte Bereiche aus der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 und Strategie zur Sequenzierung ausgewählter Fragmente

Gezeigt ist der Ausschnitt der Chr22-Region, der das Gen Chr22-5 enthält. Die Fragmente 218-1 bis 4 wurden in den Vektor ptk (49) kloniert. Die beiden Fragmente 218-3 und 4 entsprechen dem Fragment 206-3 (Tab. 6), welches eine allelische Variante zu cos218 darstellt (Abb. 27). Die mit einem Dreieck gekennzeichnete BamHI-Stelle ist in cos206 nicht vorhanden.

Tabelle 7: Sequenzierklone zur Analyse der Fragmente 218-2 und 218-3

Cosmid	Subklon	Restriktionsenden des Fragments		Fragment- länge (bp)	M13-Klone
cos218	m218-7	BamHI	BglII	840	mp10
	m218-8	PvuII	BamHI	400	mp11
	m218-9.1	BglII	PvuII	440	mp10
	m218-9.2	PvuII	BglII	440	mp11
	m218-10	BamHI	BamHI	1070	mp19
	m218-11.1	Sau3A	Sau3A	310	mp11
	m218-11.2	Sau3A	Sau3A	310	mp11
	m218-12	Sau3A	BamHI	110	mp11
	m218-13	Sau3A	BamHI	610	mp10
	m218-14	RsaI	BamHI	770	mp11
	m218-15	RsaI	BamHI	260	mp11
	m218-16	BamHI	SphI	680	mp19
	m218-17	SphI	BamHI	450	mp18

Subklone, die identische Fragmente aber in unterschiedlichen Orientierungen enthalten, sind mit .1 und .2 gekennzeichnet. Bei den in der Spalte "Restriktionsenden des Fragments" angegebenen Restriktionsnukleasen gibt die erste Nuklease das 5'-Ende, die zweite Nuklease das 3'-Ende des Fragments an.



Das Ergebnis der Sequenzanalysen der Fragmente 218-2 und 218-3 ist in Abb. 30 gezeigt. Es konnten zwei verschiedene konservierte Elemente identifiziert werden. Ein Element, welches homolog zu muARS-Elementen (49) ist, wird als CTC-Element bezeichnet. Das zweite Element zeigt Ähnlichkeit zur Sequenz der Bindungsstelle

1	GGATCCTGTGATTATGATGGTCTCCACCAGCAATTCAGGATACTCTCTGACCCCAAAATCTCAACCATGTCTGCGCAAGTTATTTTGACATATTC	100
101	TAAATAATGATCATAGATTCCAGATATTAGGACAATGATGCTTTAGTGGGTGATTATTTCATCCACAACAGCCCTCATCATCCACACATGGTCTTC	200
201	CCCTAAGGTAGAATAAAATATCACAAGGCAGATTTATGAGGTGATGACCTAGAAAAACCTGAGACTCTAGGACTGTCTGATGTGTGGATGTCAAATC	300
301	CTGGGAGATTCTGAGTCTCTGCTCTATGTGGACTCTATGTGTGTAACATTTGTGGAAGGCTCTGCTGATTTTGTGACCTAGAGAAAATGAATCTCTGC	400
401	TAAATCAAAATCAAGAAGATCGGCAAGGGAATGAAGATTCTCTAAATTTTGGAAATTTCCCTATGCAATAAACATGAGAAGTGGCAATAATTC	500
501	AAACAACGATGCCCTCCAAGATGAGGATTTTCCAATGCATTAGTTGGTCCCTCAGTGAGAAGATGCCAAGATTCGCATGACGGCAGTATATTT	600
601	ACAAAGTGCCAGAAACAAGCAAGTGAGCAAGGGAGGGAGGAGGAGGAAAGGAAAGTGAAAGTGGCTCAGAAGGAGCCACCTCTGAGGATGACGAGAGCT	700
701	CAAGCCCATAGAAACACAGGAAAAATGCCCTGTGTTATCCACTGAGAGGTGAGGAGCTGGGGATGTGTACGCCCTCCCTGTCTCATCTGATTGAC	800
801	AGCCGCTCTAGGGGATGCTAAATTCAGGCATGAGGCTGCTCATTTGCAGCTGAGCTGCTCCCAAGGTCAGATGAGCAGTGAAGGGGAGAAAGG	900
901	GCCATAGAGATGAGCTGAAGTATAATGTCTAGAATCCCCAAGGCGTAGTAACAATGACTGCAAAAAATATGCACAAAGAAAAAGCGCATTTGAATCCAG	1000
1001	AGATGTATCTCTCTGAATCTGATATATGGATCTCGGACGCTGTTGAGTGCATTTCCCAAGAAATCAGTCTCTGGAAGAGCAGCAGGAGTTGTG	1100
1101	CACAGGCTGACTACTCTGGCTGGCCACTGGTAGTCGTGCATGAGAACTACTCCCTGGAGTATTCTCAGTCCACTGACACTGATATAATTGGCTCCA	1200
1201	CTTCCCTGCTGTTGAGCGAGCCGACAGCCCTGGCAAGGCACTGTGTGAAGTATTGAGGTTCAATCAGTGCTTAAGATATGTTGGAGGCAAAAT	1300
1301	ACTTTTTCATCTACATGGGCAGTGTCTGGCAGAGATGGAGATTCTCTTAATGATCTGAGACAGGSGTGGCATCTGGGTGAGGATGATGCCCT	1400
1401	GGTGCATGGCAAGAACATGCTTGGCGCAGCAGCTGCCCCCTCGCTAAGGAGAGAGTTTCACTGACCTGGCTTTTCCCCCTCACCTGCTCTCCAGAAAGCCA	1500
1501	GACTCTAGGGCAGATGCTCTTGAGACCCAGGAACAGGCTGGTGGGAGCGCAGCTCAGAGCATCACTCAGGCGATGTGGCTTTGTATCTCACTTTGA	1600
1601	AGCAATTGACTATTGTAGCTAGATTGATACAGGGCTTCAAGTTGATTTTAAATCAGGCTCCTATAGTCAGGAGTGAAACAGAGATTTTGTGTTAAATA	1700
1701	ATGAGACCTGGTATTACTAGTCAGCTCTCATGCTGGAGAACCAAGAATTTATACCAAGGCGAGAAAGGGGATAGGATGGGATCATCAGCCAA	1800
1801	GAATAAGGTGCAGCCCAATTTAGCCCTGGTCTTAAAGAGACCCACAGCTCTGGATAATGGCAGATCC	1867

Abb. 30: Zusammenhängende Sequenz der Fragmente 218-2 und 218-3

Die Sequenz beginnt mit der zu Chr22-5 am weitesten 5'-gelegenen BamHI-Stelle des Fragments 218-3 (Abb. 29). Konservierte Sequenzelemente mit Homologien zur Bindungsstelle des Faktors NFIII aus Adenovirus 2 (108) und zu muARS-Elementen (49) sind durch gestrichelte Linien unterhalb der jeweiligen Sequenzen gekennzeichnet. Sequenzunterschiede zum Fragment 115-2 (75) sind zwischen den Positionen 1029 und 1867 unterhalb der 218-2-Sequenz angegeben. Die Oligodesoxyribonukleotide 115-29.1, 115-30.1 und 115-31 (Tabelle 6) sind durch ausgezogene Linien markiert. Der Punkt in der Sequenz von 218-2 kennzeichnet eine Deletion; das Fragment 115-2 besitzt an dieser Stelle ein C.

eines Faktors aus Adenovirus 2. Dieser Transkriptions- und Replikationsfaktor, als NFIII (nuclear factor III; Ref. 108) bezeichnet, erhöht die Effizienz der Replikation des Adenovirusgenoms (118). In Tabelle 8 wurden die identifizierten Sequenzelemente aufgelistet und mit weiteren Elementen verglichen.

Tabelle 8: Konservierte Sequenzelemente in den Fragmenten 218-2 und 218-3 und deren Vergleich mit anderen Sequenzelementen

CTC- und NFIII- Elemente	Nukleotidsequenzen und Konsensussequenzen									
	CTC	N _{1,2}		GAG	N ₀₋₅			A ^{GG} _{CC} AA		

humane CTC-Elemente										
Position 681- 696:	CTC	T		GAG		GATG		ACGAg		
Position 1517-1534:	CTC	CT		GAG		ACCCC		AGGAA		

Konsensussequenz der so- genannten muARS-Elemente	CTC	T A		GAG				A ^{GG} _{CC} AA		

	T	N _{2,3}	A	T	A	A	T	G	A	G
humane NFIII-Elemente										
Position 101- 111:	T	AA	A	T	A	A	T	G	A	t
Position 515- 526:	T	CCA	A	g	A	A	T	G	A	G
Position 1694-1705:	T	GAA	A	T	A	A	T	G	A	G
Position 187- 177:	T	GG	A	T	g	A	T	G	A	G

Adenovirus 2 NFIII-										
Bindungsstelle	T	ATG	A	T	A	A	T	G	A	G

Das CTC-Element an Position 1517-1534 ist in den Subklonen p115-29.1 und 29.2 enthalten, das NFIII-Element an Position 1694-1705 in den Subklonen p115-30.1 und 30.2 (Tabelle 6). Die weiteren Sequenzelemente wurden durch computergestützte Suche mit den Konsensussequenzen CTCN_{1,2}GAGN₀₋₅A^{GG}_{CC}AA und TN_{2,3}ATAATGAG identifiziert; ein Nukleotidaustausch zur Konsensussequenz war erlaubt. Nukleotidpositionen, die unterschiedlich zur Konsensussequenz sind, sind durch Kleinbuchstaben angegeben. Variable Positionen sind mit N gekennzeichnet, tiefgestellte Zahlen geben die Anzahl zusätzlich erlaubter Nukleotide an.

Wie das Ergebnis der Sequenzanalysen zeigt, kommen in den beiden Fragmenten 218-2 und 218-3 sowohl CTC- als auch NFIII-Elemente vor. Zur Klärung der Frage, welches der beiden Sequenzelemente für die Entstehung des tk^+ -Phänotyps der Ltk^- -Zellen in dem Transformationstest verantwortlich ist, wurden sowohl das synthetische CTC-Element, entsprechend Position 1517-1534 (Abb. 30), als auch das NFIII-Element, entsprechend Position 1694-1705, in den Vektor ptk kloniert und getestet. Die Testergebnisse sind aus Tabelle 6 zu entnehmen. Beide Elemente können zum tk^+ -Phänotyp der L-Zellen führen. Das CTC-Element ist jedoch nur dann positiv, wenn mehrere Kopien davon hintereinandergeschaltet sind (Klon p125-29.2; Tabelle 6).

2.4.4. Lokalisierung der konservierten Sequenzelemente innerhalb des K-Locus

Bemerkenswert an der Verteilung der CTC- und NFIII-Elemente innerhalb der Fragmente 218-2 und 3 ist, daß beide jeweils eine Kombination an CTC- und NFIII-Elementen enthalten (Abb. 30). Um zu klären, ob diese Kombination von verschiedenen Elementen nur in den 5'-Flanken der besprochenen V_{KI} -Orphongene vorkommt oder auch bei anderen V_K -Genen, wurden Cosmidklone, die große Teile des K-Locus überdecken, mit den Oligodesoxyribonukleotiden 115-29.1 (CTC-Element) und 30.1 (NFIII-verwandtes Element) nach dazu homologen Sequenzen abgesucht. Die Hybridisierungsversuche wurden für die beiden ^{32}P -endmarkierten Proben unter den gleichen Bedingungen durchgeführt (Waschen mit 200 mM Phosphat bei 23°C, 2x5 min). Das NFIII-Element ergab zusätzlich zu den Orphons Signale mit einigen Cosmidklonen des K-Locus. Ein starkes Signal mit den Genen L4(Vc) und L14(Vc") aus den L-Regionen (104, 105) konnte auf eine Sequenz von 12 bp im Intron des Signalpeptidanteils zurückgeführt werden. Diese stimmt in allen 12 Positionen mit der verwendeten Probe überein. Sequenzen an analogen Stellen in den Introns anderer V_{KI} -Gene, die sich an einer Position von 115-30.1 unterscheiden, ergaben unter den angewendeten Hybridisierungs- und Waschbedingungen kein Signal. Weiterhin positiv waren die Genregionen A10, A13/14 und A30 (148); die O- und W-Regionen

ergaben kein Signal. Die Probe 115-29.1 ergab nur Signale mit den an allen Positionen übereinstimmenden Sequenzen aus cos115 und cos218.

In welcher Form die CTC- und NFIII-Elemente an der Entstehung des Gens Chr22-5 und den dazu homologen Genen der Regionen Z1, Chr1 und cos118 möglicherweise beteiligt gewesen sein könnten, wird in 3.7. ausführlicher diskutiert.

2.5. Übersicht der bearbeiteten Cosmide und Subklone

In der Tabelle 9 befindet sich eine Zusammenstellung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierten Cosmidklone. Im Teil a sind diejenigen Cosmide aufgelistet, die im Verlauf der eigenen Versuche isoliert wurden. Deren Charakterisierung ist in den Kapiteln 2.2. (B-Region) und 2.3. (W-Regionen) ausführlich behandelt.

Im Teil b sind diejenigen Cosmide aufgelistet, die von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe isoliert wurden. Die Zuordnung der Klone zu den verschiedenen Regionen erfolgte nach Kartierung ausgewählter Spaltstellen und Vergleich dieser Karten mit denjenigen bereits charakterisierter Cosmide des K-Locus.

Eine Zusammenstellung von Subklonen, die für Extensionsversuche und zur Charakterisierung von Cosmidklonen konstruiert wurden, befindet sich in der Tabelle 10.

Tabelle 9a: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte und charakterisierte Cosmide

Cosmid ^{a)}	Suchklon ^{b)}	Region ^{c)}
238	m654-1	Wb 20- 58
239	m165-5	Z-Familie
240	m165-5	Z-Familie
752	m654-1	Wb 0- 40
753	m654-1	Wa 62-100*
754	m654-1	Wb 50- 80*
755	m654-1	Wb 15- 50
756	m654-1	Wb 35- 75*
757	m654-1	Wb 60- 90*
758	m654-1	Wb 10- 45*
759	m654-1	Wa 70-105*
760	m654-1	Wb 50- 80*
761	m654-1	Wb 25- 60*
762	m654-1	Wb 10- 45*
763	m654-1	Wb 35- 75*
764	m654-1	Wb 10- 45*
765	m654-1	Wb 25- 60
766	m654-1	Wa 62-100*
767	m654-1	Wb 35- 75*
768	m654-1	Wa 70-105*
769	m654-1	Wb 70-105*
770	m654-1	Wb 35- 75*
771	m654-1	Wa 62-100*
772	m654-1	Wb 60- 90*
773	m654-1	Wb 10- 45*
774	m654-1	Wb 25- 60*
775	m654-1	Wb 58- 88
607/6	mAF2-10	BJ _K C _K 25- 69
Wo1 bis Wo14	m165-5	Z-Familie

- a) Die Cosmide sind nach fortlaufenden Nummern eingeordnet. Die Nomenklatur ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert.
 b) Die Suchklone m654-1 und m165-5 sind in den Kapiteln 2.3. ff beschrieben, der Klon mAF2-10 in Ref. 65.
 c) Bei den mit (*) gekennzeichneten Angaben wurde die Lage des Cosmids nicht genau bestimmt; die Lokalisierung beruht auf Hybridisierungsdaten mit Klonen aus dem jeweiligen Bereich und der Anwesenheit charakteristischer Fragmente (Abb. 7 und 8).

Tabelle 9b: Cosmidklone, die von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe isoliert und in der vorliegenden Dissertation weiter bearbeitet wurden

Cosmid ^{a)}	isoliert ^{b)}	Suchklon ^{c)}	Region ^{d)}	Referenz
19	M.P.	m1-3	Lb 64-100	(51)
129	H.G.B.	m41-7	La 78-122	(51)
130	H.G.B.	m41-7	Aa 84-127	(148)
131	H.G.B.	m41-7	Aa 78-119	(148)
133	H.G.B.	m21-4	La 70-105	(51)
139	H.G.B.	m21-4	Ab 95-132	(148)
177	H.D.P.	m167-1	Wc 107-152	vorl. Arbeit
178	H.D.P.	m167-1	Wc 88-137	vorl. Arbeit
188	H.D.P.	m167-1	Wc 90-127	vorl. Arbeit
206	H.D.P.	m607-3	Chr22 63-105	(75)
212	B.S.	m607-3	Aa 76-122	(148)
218	B.S.	m607-3	Chr22 63-105	(75)
501	H.G.B.	m21-4	La 70-105	(51)
654	H.D.P.	m607-3	Wb 35- 78	(107)

- a) Die verwendete Nomenklatur entspricht derjenigen aus Teil a dieser Tabelle.
 b) Die Cosmide wurden isoliert von: B.S. = Bernhard Straubinger (146), H.D.P. = Hans-Dieter Pohlenz (106), H.G.B. = Hans-Günther Bauer (8), M.P. = Michael Pech
 c) Der intergenische Klon m167-1 ist in Ref. 107 beschrieben; die aus Genregionen stammenden Klone sind in Kapitel 4.4. erläutert.
 d) Die Lage der Cosmidklone innerhalb der jeweiligen Region ergibt sich aus den angegebenen Kartenpositionen in kb.

Tabelle 10: Subklone, die zur Charakterisierung von Cosmiden sowie für Extensions- und Transfektionsversuche konstruiert wurden

Herkunft ^{a)}	Bezeichnung	Fragment ^{b)}	Vektor
cos115	p115-29.1	CTCCTGAGACCCCAGGA	ptk
	p115-29.2	4x CTCCTGAGACCCCAGGA	ptk
	p115-30.1	TGAAATAATGAG	ptk
	p115-30.2	2x TGAAATAATGAG	ptk
	p115-31	AGGAGAGAGGCTC	ptk
cos165	p165-3	4,0 kb BamHI/BglII	pBR322
	m165-5	0,9 kb Sau3A	mp10
cos170	m170-1	0,5 kb BamHI/BglII	mp10
cos171	p171-4	7,0 kb ClaI/SalI	pBR322
p171-4	m171-1	1,1 kb BglII/XhoI	mp8
	m171-2	0,6 kb BglII	mp8
	m171-3	0,8 kb BglII	mp8
cos177	m177-1	2,4 kb BglII/XhoI	mp8
cos206	p206-1	3,7 kb BglII	ptk
	p206-2	0,8 kb BglII/BamHI	ptk
	p206-3	2,9 kb BglII/BamHI	ptk
cos218	p218-1	3,7 kb BglII	ptk
	p218-2	0,8 kb BglII/BamHI	ptk
	p218-3	1,1 kb BamHI	ptk
	m218-3	1,1 kb BamHI	mp10
	p218-4	1,8 kb BamHI/BglII	ptk
	m218-5	0,1 kb BglII/SmaI	mp10
	m218-6	0,5 kb BglII/SmaI	mp10
	p238-1	4,0 kb ClaI/SalI	pBR322
p238-1	m238-2	1,0 kb BglII/HpaI	mp10
cos607/6	m607/6-1	1,0 kb KpnI/HindIII	mp18
cos654	m654-1	1,0 kb AluI	mp10
	p654-3	7,0 kb BamHI	pBR322
	p654-4	5,0 kb BglII	pUC18

- a) Die Cosmide und Plasmide sind nach fortlaufenden Nummern aufgelistet. Die Nomenklatur entspricht derjenigen von Tabelle 9.
- b) Sind zwei Restriktionsnukleasen angegeben, dann bezeichnet die erste Angabe das 5'-Ende, die zweite Angabe das 3'-Ende des Fragments. Die synthetischen Desoxyribonukleotide sind in die ClaI- (115-29.1 und 29.2), HindIII- (115-30.1 und 30.2) und ClaI/-HindIII-Stellen des Vektors ptk kloniert. Sie wurden anhand der 115-2-Sequenz (75) synthetisiert.

3. Diskussion

3.1. Probleme bei der Strukturaufklärung großer Abschnitte des menschlichen Genoms

Die Kartierung des menschlichen Kappa-Locus mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFG) ergab, daß dieser Locus einen Bereich von ungefähr 2 Mb umfaßt (79). Die Strukturaufklärung eines Abschnitts dieser Größenordnung durch Isolierung und Charakterisierung überlappender Klone bereitet Probleme. Diese ergeben sich zum großen Teil daraus, daß bestimmte DNA-Sequenzen in einem vorgegebenen Vektor- und Wirtssystem nicht oder nur sehr schwierig zu klonieren sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit traten solche Klonierungsprobleme in zwei Fällen auf.

In mehreren Versuchen, die Wa- bzw. die B-Region in 5'-Richtung zu extendieren, ist es bestenfalls gelungen, Cosmidklone zu isolieren, die bereits zuvor klonierte Abschnitte des Genoms enthielten (2.3.1.4.). Gründe hierfür können darin liegen, daß entweder keine extendierende Cosmidklone in der jeweiligen Genbank vorhanden sind oder die entsprechenden Klone konnten aufgrund arbeitstechnischer Probleme beim Absuchen der Banken nicht identifiziert werden. Für Letzteres können Eigenschaften der verwendeten Proben oder Hybridisierungsartefakte verantwortlich sein.

Dafür, daß einzelne Abschnitte des Genoms in einer Genbank unterrepräsentiert sein können, kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Eine nicht-statistische Verteilung bzw. unterschiedliche Zugänglichkeit der zur Konstruktion der Bank benötigten Spaltstellen können dazu führen, daß die durch Partialspaltung der genomischen DNA erzeugten Fragmente nicht die richtige Größe für die Klonierung in dem verwendeten Vektor besitzen.

Für den negativen Ausgang der Extensionsversuche in dieser Arbeit sollten jedoch andere Gründe verantwortlich sein, da mehrere Banken abgesucht worden sind, zu deren Konstruktion verschiedene Restriktionsnukleasen und zum Teil unterschiedliche Cosmidvektoren verwendet worden sind (2.1.1.).

Instabilität der zu klonierenden DNA-Sequenzen in einem gegebenen Wirtssystem kann ebenfalls zu deren Verlust aus Genbanken führen. Solche rekombinogenen Regionen sind in den Bakterien schwierig stabil zu vermehren; dies konnte z.B. bei dem Cosmid cos607/6 der B-Region beobachtet werden.

Theoretisch kann man sich vorstellen, daß die zu klonierenden Bereiche in irgendeiner Form das Wachstum der Wirtszellen hemmen, z.B. indem sie für das bakterielle Wachstum wichtige Faktoren abfangen. Dies kann zum Verlust des jeweiligen Klons aus der Genbank führen.

DNA-Bereiche, die in einem gegebenen Vektor- und Wirtssystem nicht oder nur schwer klonierbar sind, wurden unter anderem bei den Versuchen, den α -Globin-Locus (98), den T-Zellrezeptor-V $_{\beta}$ -Locus (68) bzw. das Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (22) in Cosmiden zu klonieren, beobachtet.

Die erwähnten Probleme bei der Strukturaufklärung des K-Locus durch Cosmidklonierung könnten unter Umständen durch Wechsel des Vektor- und/oder Wirtssystems gelöst werden. Als alternative Vektoren kämen der Phage λ in Frage, in dem Fragmente bis zu einer Größe von 20 kb kloniert werden können oder YACs (yeast artificial chromosomes; 15), die das Klonieren von Fragmenten bis zu einer Größe von mehreren 100 kb erlauben. Letzteres wurde zur Klonierung des Genoms von *C. elegans* erfolgreich angewendet (22).

Eine weitere Strategie zur Lösung von Klonierungsproblemen besteht in einer Anreicherung der gewünschten Sequenzen vor deren Klonierung. Mit Hilfe von recA-Protein und biotinyliertem Einzelstrang als Suchklon können die zur verwendeten Probe homologen Klone vorab angereichert werden (112). Eine alternative Anreicherungsmethode stellt die Isolierung von Fragmenten aus Gelen nach vorheriger präparativer Elektrophorese dar. Dieser Ansatz wurde zur Extension klonierter Bereiche des α -Globin-Locus erfolgreich angewendet (98).

Unter Verwendung der beschriebenen Alternativen zur Cosmidklonierung könnten bisher nicht klonierbare Abschnitte des K-Locus unter Umständen isoliert werden.

3.2. Inversion der C_K -proximalen Gene B2 und B3 ist Voraussetzung für deren Umlagerungen an $J_K C_K$

Während der Reifung Antikörper-produzierender B-Zellen werden die für die variablen Anteile der Immunglobuline kodierenden Gensegmente durch somatische Rekombination an J_K -Segmente umgelagert (Übersichten in Ref. 50 und 151). Von der Orientierung der beiden Rekombinationspartner hängt es ab, nach welchem Mechanismus die VJ-Umlagerung erfolgt. Sind die V- und J-Segmente in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert, so kann durch Deletion der dazwischenliegenden DNA das V-Gen mit einem der fünf J_K -Segmente verknüpft werden (Deletionsmodell: 122, 134; Schwesterchromatid-austausch: 46, 152). Ist die Transkriptionsrichtung des umzulagernden V-Gens derjenigen von $J_K C_K$ entgegengesetzt, dann sollte die VJ-Umlagerung nach einem Inversionsmechanismus (72) erfolgen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungene Isolierung eines Cosmidklons, der die B- mit der $J_K C_K$ -Region verbindet (2.2.1.), erlaubte zum ersten mal in einem Immunglobulin-Locus von Säugern sowohl den Abstand der V- und J-Segmente als auch deren relative Orientierung zueinander sicher zu bestimmen. Danach befindet sich das $J_K C_K$ -proximale Gen B3, welches das einzige Mitglied der Subgruppe IV darstellt (67, 87), 23 kb 5' von $J_K 1$. Die Transkriptionsrichtung der beiden Gene B3 und B2 ist derjenigen von $J_K C_K$ entgegengesetzt.

Analysen anderer Immunglobulin-Loci zeigten, daß in den Fällen, in denen eine V-C-Verknüpfung gelang, die V- und C-Segmente in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert sind. Dies trifft für den IgH-Locus des Menschen (126), den λ -Locus beim Huhn (111) und den IgH-Locus des Dornhais (45) zu. Beim ersten Beispiel befindet sich das einzige V_H -Gen der Subgruppe VI im Abstand von maximal 70 kb 5' von den J_H -Segmenten (126). Im λ -Locus des Huhns ist das C-proximale V-Gen nur 1,7 kb 5' der J-Segmente lokalisiert (111). Im IgH-Locus des Dornhais kann jedem C-Segment ein einziges V_H -Gen zugeordnet werden. Der V_H - C_H -Abstand beträgt jeweils ungefähr 10 kb (45).

Die entgegengesetzte Orientierung des Gens B3 und der J_K -Segmente bestätigt die nach dem Inversionsmodell (72) zu fordernde Anordnung der an der Umlagerung beteiligten Rekombinationspart-

ner. Ein an J_K umgelagertes B3-Gen konnte in lymphoiden Zelllinien durch Hybridisierungsanalysen identifiziert (67) und durch Klonierung und Sequenzierung charakterisiert werden (67, 87, 142). In Abb. 31 ist eine schematische Darstellung der Ereignisse gezeigt, die in der Zelllinie BL21 (71) zur B3- J_K -Verknüpfung geführt haben könnten. Diese erfolgte in zwei Schritten, indem zunächst durch Inversion des Gens B2 dieses an J_{K1} umgelagert wurde. Dadurch erhielt B3 die gleiche Orientierung wie die J-Segmente und konnte somit im zweiten Schritt durch Deletion an eines der Segmente J_{K2} bis J_{K5} umgelagert werden. Dies führte zum Verlust des zuvor gebildeten Umlagerungsprodukts B2- J_{K1} . Diese Abfolge von Ereignissen läßt sich aus dem Vorhandensein der jeweiligen Umlagerungsprodukte in der Zelllinie BL21 schließen (65).

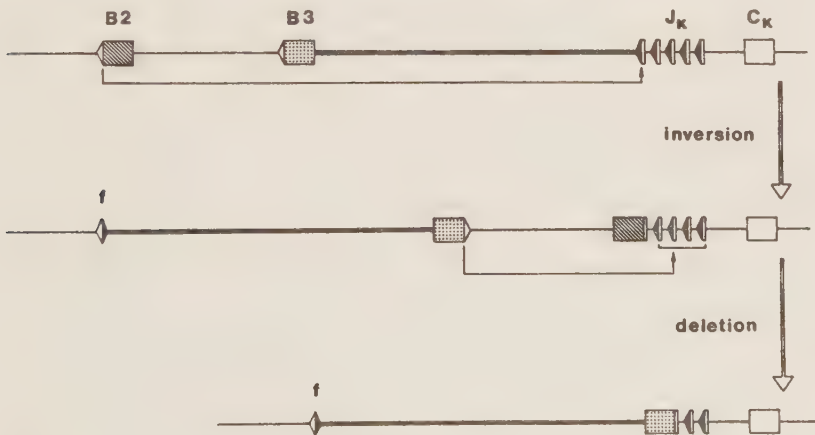


Abb. 31: Umlagerung des Gens B3 an $J_K C_K$ in der Zelllinie BL21

Die Abbildung ist Ref. 65 entnommen und zeigt die Abfolge von Umlagerungen, wie sie in der Zelllinie BL21 (71) stattgefunden haben. In dieser Zelle wurde das Gen B3 an ein J_K -Segment umgelagert. V_K -, J_K - und C_K -Segmente sind als Rechtecke eingezeichnet. Der Bereich von 23 kb zwischen B3 und J_{K1} ist durch einen stärkeren Strich gekennzeichnet. Die Signalsequenzen der Rekombination sind als offene und ausgefüllte Dreiecke, das f-Fragment als ein Rhombus eingezeichnet. Die an der jeweiligen Umlagerung beteiligten Rekombinationspartner sind durch Pfeile miteinander verbunden. Das an der zweiten Umlagerung beteiligte J_K -Segment ist bisher nicht identifiziert worden; dies wird durch eine Klammer angedeutet.

Weitere Beispiele für die VJ-Umlagerungen nach dem Inversionsmechanismus sind die Umlagerungen der Gene $V_{\beta 14}$ (84) und $V_{\delta 5}$ (55) aus den T-Zellrezeptor-Loci der Maus. In beiden Fällen befinden sich diese V-Segmente 3' der jeweiligen C-Segmente und können nur nach einem Inversionsmechanismus an diese umgelagert werden.

3.3. Die W-Regionen als Orphans auf Chromosom 2

Im Rahmen der Strukturaufklärung des humanen K-Locus, der auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 lokalisiert ist (83, 89), konnten einige V_K -Gene enthaltende Bereiche isoliert werden, die nicht auf Chromosom 2 lokalisiert sind (76, 77, 147). Diese wurden entsprechend den transponierten Genen anderer Multigenfamilien als Orphans bezeichnet (17). Beispiele hierfür stellen die transponierten Mitglieder der Histogenfamilien beim Seeigel und bei *Drosophila*, sowie der rRNA-Gene bei der Hefe dar (17).

Die Schwierigkeiten, die sich zunächst bei der Klassifizierung der W-Regionen als Orphans ergaben, beruhten erstens darauf, daß diese Regionen, wie der K-Locus, auf Chromosom 2 lokalisiert sind (74). Zweitens stimmte deren Organisation gut mit derjenigen des K-Locus überein; die beiden Duplikate Wa und Wb enthalten jeweils V_K -Gene der Subgruppen I bis III. Im Verlauf der weiteren Charakterisierungen der W-Regionen mehrten sich jedoch die Hinweise dafür, daß diese Gene möglicherweise nicht Bestandteil des K-Locus sind. Der Verdacht konnte durch die Analyse somatischer Zellhybride erhärtet werden (2.3.2.2.). Danach befinden sich die W-Regionen in dem Abschnitt von Chromosom 2, der in der Zelllinie RRP-5-3 (besitzt ein $2p^-$ -Chromosom; 135) noch vorhanden ist; der K-Locus hingegen ist in RRP5-3 verlorengegangen (2.3.2.2.). Da jedoch die genaue Lage des Bruchs, der zur Entstehung des $2p^-$ -Chromosoms in RRP5-3 (135; Abb. 17) führte, nicht bekannt ist, konnte aus diesen Daten nicht auf den Abstand der W-Regionen zum K-Locus geschlossen werden. Eine Abschätzung der Entfernung dieser beiden Loci ist, aufgrund der Ergebnisse von in situ-Hybridisierungsexperimenten, die von H. Hamelster, Universität Ulm, durchgeführt wurden, möglich. Für diese Experimente wurden zum einen der Subklon m654-1 (Abb. 10), zum anderen jeweils ein Cosmid aus Wa, Wb

und Wc (cos165, cos140 und cos177; Abb. 4 und 10) verwendet. Jeder dieser vier Klone ergab ein spezifisches Signal mit der Bande 2q11. Aus den Lokalisierungen der W-Regionen in 2q11 und des K-Locus in 2p12 (83, 89) läßt sich die Größenordnung des Abstands der beiden Loci abschätzen. Aus dem Verhältnis des Abstands der Banden 2p12 und 2q11 zur Gesamtlänge des Chromosoms 2 und dessen Größe von ungefähr 200 Mb (27, 97), ergibt sich für die Entfernung der W-Regionen zum K-Locus ein Wert von mehreren Megabasen.

Aufgrund der Lage der W-Regionen außerhalb des K-Locus sind diese, wie die Mitglieder der Z- (147) und Chr1-Familien sowie die Chr22-Region (76, 77), als Orphons zu bezeichnen. Die Verwendung der Gene W1 bis W11 zur Bildung leichter Antikörperketten ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. Die Umlagerung dieser V-Gene an C_K müßte zum einen über das Zentromer hinweg erfolgen, zum anderen sind alle Gene der W-Regionen Pseudogene, deren Transkription und Translation zu nicht-funktionellen Proteinen führt. Denkbar ist jedoch, daß die Gene W1 bis W11 dennoch zur Diversitätserzeugung der Antikörper beitragen, indem sie an Vorgängen wie Genkonversionen beteiligt sein könnten. Bei Genen aus dem MHC-Locus der Maus konnte gezeigt werden, daß Genkonversion zwischen Loci, die ca. 2 Mb voneinander entfernt sind, möglich ist (93).

3.4. Die W-Regionen als Amplicons: Größe und Anordnung der amplifizierten Einheiten

Amplifikation von DNA-Sequenzen ist ein weit verbreitetes Phänomen von beträchtlicher biologischer Bedeutung (Übersichten in Ref. 39, 128, 129, 141). Sie kann als regulierter Prozeß während der Entwicklung bestimmter Organismen vorkommen (z.B. Amplifikation der Choriongene bei Drosophila; 139) oder als zufälliges Ereignis, das unter Selektionsdruck nachweisbar wird. Letzteres trifft z.B. für die Amplifikation des Dihydrofolatreduktasegens (dhfr) unter Methotrexat-Selektion zu (5). Amplifikationen von Genen ohne offensichtlichen Selektionsdruck sind in einigen Tumorzellen beobachtet worden, z.B. von c-myc und N-myc (4, 131).

Amplicons zwischen 130 und 170 kb. Die unterschiedlichen Größen ergeben sich aus den verschiedenen 5'-Grenzen der einzelnen Amplicons; die amplifizierte Einheit in Wc ist im Vergleich zu derjenigen in Wa um 40 kb im 5'-Bereich verkürzt (Abb. 10 und 32). Die in der Literatur angegebenen Amplicongrößen reichen von 135 bis 3000 kb (Übersicht in 141). Somit zählen die Amplicons der W-Regionen, trotz der angenommenen Maximalgrößen, zu den kleinsten der bisher beschriebenen amplifizierten Einheiten. In Abb. 32 sind die W-Regionen als invertiert angeordnete Amplicons mit Maximalgrößen gezeigt. Die aus den experimentellen Daten abgeleitete Anordnung stimmt in dieser Form mit derjenigen in der Literatur beschriebener Amplicons gut überein. Die wesentlichen Strukturmerkmale der Amplicons der W-Regionen, invertierte Anordnung und unterschiedliche Größen der amplifizierten Einheiten sowie das Vorkommen kurzer Abschnitte nicht-amplifizierter DNA zwischen zwei Amplicons wurden auch bei amplifizierten Dihydrofolatreduktase- (81), CAD- (6, 36, 121), c-myc- (36) und Adenylatdesaminasegenen (53, 54) gefunden. Wie oben bereits erwähnt besteht ein Unterschied zwischen den Organisationen der amplifizierten Abschnitte der W-Regionen und denen der übrigen Amplicons darin, daß letztere in der Regel einen wesentlich höheren Amplifikationsgrad aufweisen; es werden Kopienzahlen von zehn bis mehrere hundert erreicht (Übersicht in Ref. 141). Die Kenntnis des Amplifikationsgrades ist für die noch zu diskutierenden Mechanismen der Amplifikation von Bedeutung.

In den folgenden beiden Kapiteln werden Ereignisse, die zur Entstehung der W-Regionen geführt haben könnten, diskutiert. In Kapitel 3.5 wird dabei speziell auf mögliche, zeitliche Abfolgen von Ereignissen eingegangen, im darauffolgenden Kapitel werden in Frage kommende Mechanismen der Amplifikation, wie Überreplikationen bzw. ungleiches Cross-over, diskutiert.

3.5. Evolution der W-Regionen: Sukzessive Amplifikationen führten zur Entstehung von Wa, Wb und Wc

Für die zu diskutierenden Evolutionsmodelle der W-Regionen sind im wesentlichen drei Aspekte von Bedeutung: die Anzahl der vorhandenen W-Kopien, deren Verwandtschaftsgrade und die Lokalisation der verschiedenen Kopien außerhalb des K-Locus.

Wie in 3.4. beschrieben, setzen sich die W-Regionen aus vier verschiedenen Amplicons zusammen (I bis IV in Abb. 32). Für den zeitlichen Verlauf ihrer Entstehung kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht. Entweder entstanden die vier Amplicons gleichzeitig, z.B. durch einmalige Überreplikation eines gemeinsamen Vorläufers, oder zu verschiedenen Zeitpunkten während der Evolution durch mehrere, unabhängige Amplifikationsvorgänge.

Zwischen beiden Möglichkeiten kann unterschieden werden, wenn die Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Amplicons bekannt sind. Diese sind sowohl durch Vergleiche der jeweiligen Restriktionskarten, als auch durch Vergleiche der Sequenzen von Genen aus unterschiedlichen Amplicons zu bestimmen. Bei dem Ansatz, Verwandtschaftsgrade durch Sequenzvergleiche zu ermitteln, geht man davon aus, daß zwei miteinander verwandte Regionen sich um so stärker voneinander unterscheiden, je früher sie in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind ("molecular-clock"-Modell; 158).

Die Ergebnisse der Karten- und Sequenzvergleiche sind aus Abb. 33 ersichtlich. Die in Abb. 33a angegebene Anzahl an Spaltstellenunterschieden ergibt sich aus Vergleichen der Restriktionskarten 40 kb großer Bereiche aus den verschiedenen Amplicons. Drei Spaltstellenunterschiede zwischen den invertiert angeordneten Duplikaten in Wb sind die Folge einer Deletion von 1 kb im Amplicon II (Kartenposition 92 kb in Abb. 10). Ein Abschnitt von 40 kb aus Wc wurde mit dem dazu homologen Bereich aus Wa verglichen; der entsprechende Abschnitt aus Wb ist nicht durch Cosmide repräsentiert und kann somit nicht in die Vergleiche einbezogen werden. Im Teil b der Abb. 33 sind die Ergebnisse der Sequenzvergleiche angegeben. Es wurden entweder 800 bp (beim Vergleich W3/W9/W11) oder 1000 bp lange Abschnitte in die Vergleiche einbezogen. Die Ergebnisse der Karten- und Sequenzvergleiche lassen den Schluß

zu, daß die verschiedenen Amplicons zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Da bei sämtlichen Vergleichen eine geringere Anzahl von Unterschieden zwischen den Amplicons II und III, den beiden invertiert angeordneten Duplikaten in Wb (Abb. 32), als

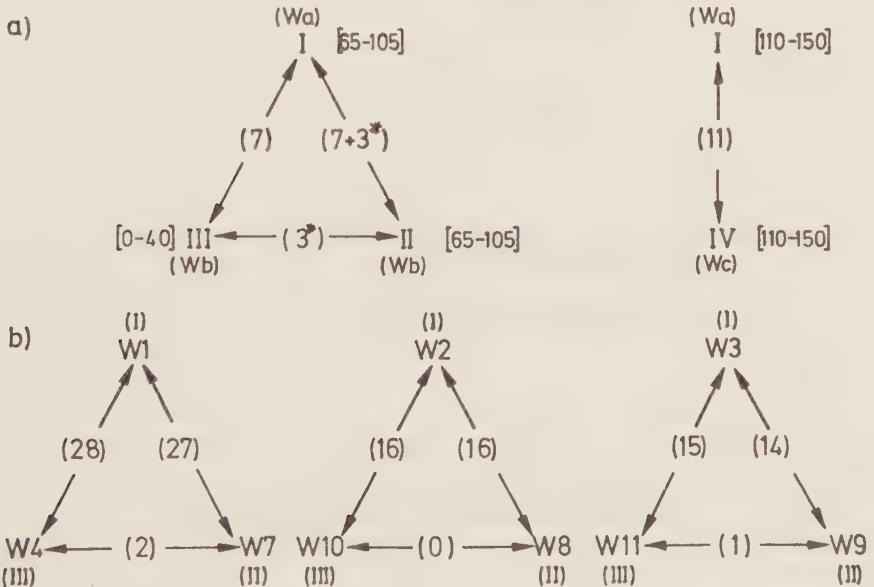


Abb. 33: Anzahl von Spaltstellen- und Sequenzunterschieden zwischen verschiedenen Amplicons der W-Regionen

Im Teil a der Abbildung geben die Zahlen in runden Klammern die Anzahl der Spaltstellenunterschiede zwischen den einzelnen Amplicons (I-IV) an. Die ausgewerteten Spaltstellen sind Abb. 10 zu entnehmen. Es wurden jeweils 40 kb große Abschnitte miteinander verglichen. Die Kartenpositionen der in die Vergleiche einbezogenen Bereiche sind in eckigen Klammern angegeben. Die Angaben beziehen sich auf den Maßstab in Abb. 10. Die mit * markierte Angabe bedeutet, daß sich die drei Spaltstellenunterschiede durch Deletion eines 1 kb großen Abschnitts im Amplicon II ergeben.

Im Teil b ist die Anzahl der Sequenzunterschiede zwischen zwei Genen aufgeführt. Die römischen Ziffern in Klammern geben an, aus welchem Amplicon das jeweilige Gen stammt.

zwischen II und I ermittelt wurden, sollte die Wa-Region mit den Genen W1, W2 und W3 (Amplicon I) zu einem früheren Zeitpunkt als das invertiert angeordnete Duplikat in Wb mit den Genen W4, W10 und W11 (Amplicon III) entstanden sein.

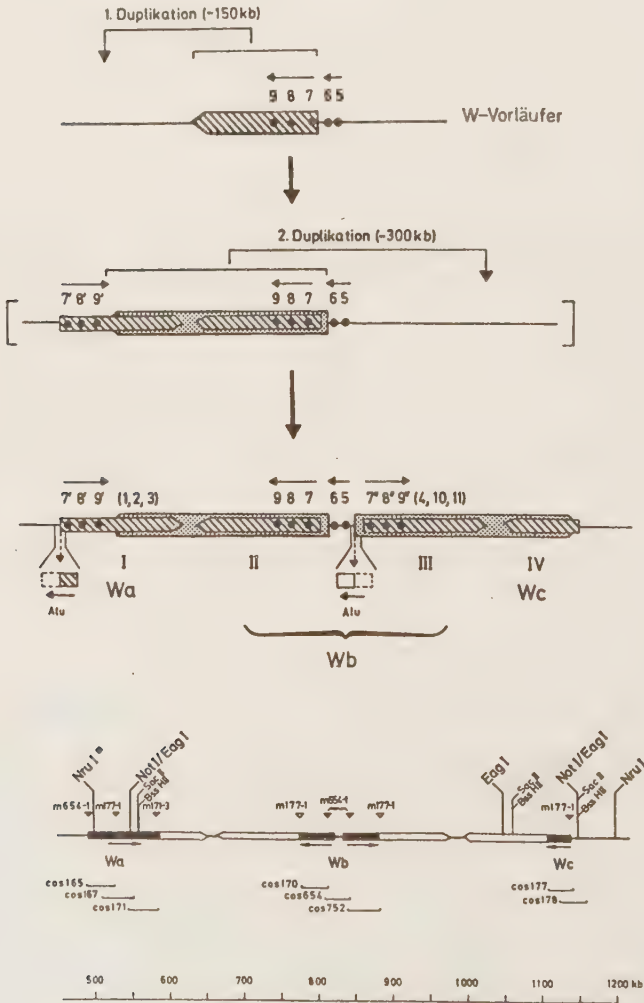


Abb. 34

In Abb. 34 ist eine Abfolge von zwei Duplikationsereignissen dargestellt. Anhand derer kann die Entstehung der vier Amplicons der W-Regionen erklärt werden. Danach enthielt ein Vorläufer der heutigen W-Regionen fünf V_K -Gene (5 bis 9), die ähnlich wie die Gene W5 bis W9 in Wb angeordnet waren (alle Gene in einer Transkriptionsrichtung). In einem ersten Amplifikationsschritt wurde ein ca. 150 kb großer Bereich derart amplifiziert, daß zwei invertiert angeordnete Duplikate entstanden (Amplicons I und II). Das neu gebildete Amplicon mit den Genen W7', W8' und W9' stellt

Abb. 34: Abfolge von Duplikationsereignissen während der Evolution der W-Regionen

Gezeigt ist eine Abfolge von zwei Duplikationsereignissen, mit denen sich die Entstehung der W-Regionen aus einer Vorläuferregion erklären läßt.

Den Ausgangspunkt bildet ein W-Vorläufer mit den Genen 5 bis 9, die alle dieselbe Transkriptionsrichtung besitzen. Die Gene sind als schwarze Punkte dargestellt. Zu dem Zeitpunkt, an dem die 1. Duplikation erfolgte, kann diese Region noch Bestandteil des K-Locus oder bereits transponiert gewesen sein. Der schraffiert dargestellte Bereich von ungefähr 150 kb wurde derart amplifiziert, daß zwei invertiert angeordnete Kopien entstanden. Diese sind als schraffierte Pfeile dargestellt. In eckigen Klammern ist die Struktur eines hypothetischen Zwischenprodukts in der Evolution der W-Regionen gezeigt; diese Zwischenstufe setzte sich aus zwei Amplicons zusammen. In einem zweiten Amplifikationsschritt wurde ein Bereich von 300 kb, gepunkteter Abschnitt, dupliziert. Dieser Vorgang führte zur Entstehung der Amplicons III und IV. Innerhalb des die Amplicons I bis IV umfassenden Bereichs gibt es Abschnitte, die in drei bzw. vier Kopien, gekennzeichnet durch schraffierte Pfeile, in zwei Kopien, ausschließlich gepunktete Anteile der dickeren Pfeile, sowie in nur einer Kopie, markiert durch ausgezogene Striche, im Genom vorkommen. Die 5'-Anteile des Amplicons I sind durch Cosmide der Wa-Region, die der Amplicons II und III durch Cosmide der Wb-Region und die 5'-Bereiche des Amplicons IV durch Cosmide der Wc-Region repräsentiert (Abb. 32). Die Gene 7', 8' und 9', die als Folge der 1. Duplikation entstanden sind, stellen die Gene W1, W2 und W3 aus Wa dar; 7'', 8'' und 9'' repräsentieren die Gene W4, W10 und W11 aus Wb. Die Gene 5 bis 9 entsprechen W5 bis W9 aus Wb. Letztere sind die im Verlauf der Evolution durch Mutationen veränderten Gene der Vorläuferregion. An den Übergängen der Amplicons I bzw. III zu nicht-amplifizierter DNA befinden sich Fragmente von Alu-Elementen; diese sind als Rechtecke unterhalb der jeweiligen Amplicons eingezeichnet. Die gestrichelten Anteile der Rechtecke bedeuten, daß die jeweiligen 3'- bzw. 5'-Anteile der Alu-Elemente nicht vorhanden sind.

Der untere Teil der Abbildung zeigt zum Vergleich die Organisation der W-Regionen, wie sie sich aus den PFG-Experimenten ergibt (Abb. 23).

den unmittelbaren Vorläufer der Wa-Region mit den Genen W1, W2 und W3 dar. In einem zweiten Amplifikationsschritt, der zu einem späteren Zeitpunkt während der Evolution erfolgte, entstanden durch Duplikation eines ca. 300 kb großen Abschnitts sowohl die Inversion in Wb mit den Genen W4, W10 und W11 (Amplicon III), als auch die Region Wc (Amplicon IV). Letztere stellt somit ein Duplikat der 3'-Anteile von Amplicon I dar.

Im folgenden Kapitel werden Mechanismen diskutiert, mit denen die Entstehung invertiert angeordneter Duplikate erklärt werden kann. Die Ergebnisse aus den Sequenzanalysen der Übergänge von amplifizierter zu nicht-amplifizierter DNA werden in diesem Zusammenhang besonders berücksichtigt.

3.6. Führten Replikationsfehler zur Amplifikation einer W-Vorläuferregion ?

Für die in Betracht zu ziehenden Mechanismen der Amplifikation sind drei Befunde zu berücksichtigen: 1. Ein Amplifikationsereignis führte zur Verdopplung des jeweiligen Bereichs. 2. Die neu gebildeten Duplikate sind invertiert zur Ausgangsregion angeordnet. 3. Die Übergänge von amplifizierter zu nicht-amplifizierter DNA befinden sich innerhalb von Alu-Elementen.

In der Literatur werden im wesentlichen zwei verschiedene Modelle diskutiert (Übersicht in Ref. 141), mit denen man die Amplifikation größerer Bereiche (>100 kb) zu erklären versucht. Dies sind Amplifikationen durch ungleiche Cross-over und Überreplikationen nach dem "Zwiebelschalen"-Modell (11, 123). In beiden Fällen können invertiert angeordnete Amplicons zwar gebildet werden, jedoch sind sie nicht notwendigerweise das Endprodukt des Amplifikationsvorgangs; im Gegenteil, die Entstehung gleichsinnig angeordneter Amplicons ist eher wahrscheinlich. Trotz dieser Einschränkung werden diese beiden Modelle zunächst als zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert, mit denen die Entstehung der W-Regionen erklärt werden kann. Im darauffolgenden Absatz werden alternative Modelle vorgestellt und diskutiert.

Mit einem Cross-over-Modell vereinbar sind die Ergebnisse, die aus den Sequenzanalysen der Amplicongrenzen (2.3.2.5.) erhalten wurden. Diese zeigen, daß sich die Übergänge von amplifizierten zu nicht-amplifizierten Bereichen innerhalb von Alu-Elementen befinden. Nach dem Cross-over-Modell sind die Amplicongrenzen die Stellen, an denen die Rekombinationen zwischen den beiden am Cross-over beteiligten Chromosomen erfolgt sind. Das Vorhandensein von Teilen von Alu-Elementen an diesen Stellen bedeutet, daß bei einem der beiden Rekombinationspartner ein Bruch innerhalb eines Alu-Elements erfolgt sein muß. Beim zweiten Rekombinationspartner ist der Bruch in einer Sequenz erfolgt, die keinerlei Homologie zu Alu-Elementen aufweist. Eine solche Situation liegt beispielsweise bei den Produkten der Philadelphia-Translokation vor. Bei dieser reziproken Translokation (t9;22) entstehen ein 9q⁺- und ein 22q⁻-Chromosom; letzteres wird als Philadelphia-Chromosom bezeichnet. Sowohl am 9q⁺- als auch am 22q⁻-Bruchpunkt befinden sich Fragmente von Alu-Elementen (26). Ein weiteres Beispiel für das Vorhandensein von Alu-Elementen an chromosomalen Bruchpunkten stellt das Produkt einer nicht-reziproken Y-X-Translokation dar, bei der Anteile vom Y-Chromosom auf ein X-Chromosom gelangten. In diesem Fall erfolgten beide Chromosomenbrüche innerhalb von Alu-Elementen (119). Neben diesen interchromosomalen Rekombinationen gibt es eine Reihe von intrachromosomalen Rekombinationen an denen Alu-Elemente beteiligt sind. Deletionen als Folge homologer Alu-Alu-Rekombinationen konnten beispielsweise im α -Globin-Locus (28) und LDL-Rezeptorgen (70) beobachtet werden. Die Bildung invertiert angeordneter Amplicons durch eine Folge ungleicher Cross-over setzt jedoch voraus, daß die an den Rekombinationen beteiligten Chromosomen eine antiparallele Anordnung einnehmen müssen. Dies wiederum bedeutet, daß doppelte Cross-over erfolgen müssen, um die Bildung von Chromosomen mit zwei Zentromeren zu verhindern. Doppelte Cross-over sollten jedoch seltene Ereignisse darstellen, was gegen die Entstehung der Amplicons I bis IV nach diesem Mechanismus spricht.

Einen alternativen Mechanismus zum Cross-over stellt die Amplifikation einer W-Vorläuferregion durch Überreplikation dar. Das für Überreplikationen am häufigsten zitierte Modell ist das sogenannte "Zwiebelschalen"-Modell (11, 123). Danach werden DNA-

Bereiche dadurch amplifiziert, daß es während eines Zellzyklus zu wiederholten Starts der Replikation an einem Replikationsursprung kommt. Dieser Prozess führt in der Regel zu einer drastischen Erhöhung der Kopienzahl des amplifizierten Abschnitts pro Amplifikationsereignis; bei der Amplifikation von CAD-Genen wurden mehr als zehn Kopien im ersten Amplifikationsschritt erzeugt (157). Die entstandenen Amplicons können linear intrachromosomal oder linear bzw. ringförmig extrachromosomal vorliegen (141). Die Bildung invertiert angeordneter Amplicons ist nach diesem Modell möglich aber nicht zwingend zu fordern.

In jüngster Vergangenheit wurden Amplifikationsmodelle entwickelt, mit denen sich speziell die Entstehung invertiert angeordneter Amplicons erklären läßt (54, 101, 120). Diese Modelle sind für das Verständnis der Evolution der W-Regionen besonders zu berücksichtigen. Hyrien et al. (54) beschreiben die Struktur der Verknüpfungsstelle zweier AMPD-Amplicons, die gut mit derjenigen der 5'-5'-verknüpften Amplicons II und III innerhalb von Wb (Abb. 10 und 32) übereinstimmt. Aus dem von diesen Autoren vorgeschlagenen Amplifikationsmechanismus (54) läßt sich der in Abb. 35 schematisch dargestellte Vorgang ableiten, mit dem die Ausbildung der Struktur an der Verknüpfungsstelle der Amplicons II und III (Abb. 32) erklärt werden kann. Das entscheidende Ereignis, das zur Überreplikation geführt haben könnte, ist ein Strangwechsel der DNA-Polymerase innerhalb der Replikationsgabel. In dem ge-

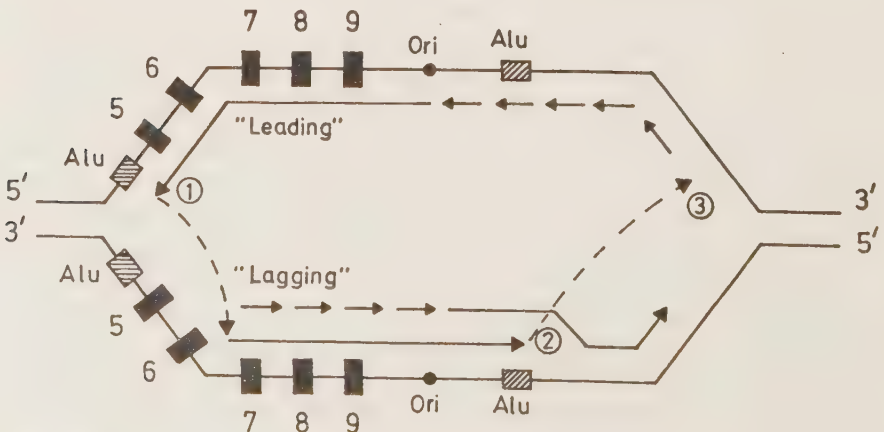


Abb. 35

zeigten Fall erfolgt der Wechsel vom "leading"-Strang zum "lagging"-Strang innerhalb eines Alu-Elements und die Polymerase setzt die Strangverlängerung von einer weiter 3'-gelegenen Stelle auf dem "lagging"-Strang aus fort (Schritt 1 in Abb. 35). Diese neue Startstelle bildet die 5'-Grenze des Amplicons III (Abb. 32). Dessen 3'-Grenze ist durch diejenige Stelle festgelegt, an der die Polymerase entweder die DNA-Synthese beendet (Schritt 2 in Abb. 35) oder auf den ursprünglichen Strang zurückwechselt (Schritt 3 in Abb. 35). Ein Abbruch der DNA-Polymerisation (Schritt 2 in Abb. 35) an bevorzugten Stellen ist innerhalb von LINE-Sequenzen, einer anderen hochrepetitiven Sequenzfamilie, beobachtet worden (24). Ein Blockieren der DNA-Synthese während der Replikation erleichtert möglicherweise Überreplikationen (128). Sich an die Überreplikation anschließende Reparatur- und Rekombinationsereignisse können zum Einbau der Überreplizierten Abschnitte in das Chromosom führen. Ein Unterschied zwischen den Vorgängen, die möglicherweise zur Entstehung der AMPD-Amplicons (54) bzw. der W-Regionen geführt haben, besteht darin, daß bei ersteren viele Amplicons während eines Zellzyklus entstanden sind, bei den W-Regionen jedoch nur eine zusätzliche Kopie des amplifizierten Abschnitts pro Amplifikationsereignis entstand. Letzteres läßt sich durch ein frühzeitiges Abstoppen der Überreplikation innerhalb des entsprechenden "Replikationsauges" erklären.

Abb. 35: Überreplikation durch Strangwechsel der DNA-Polymerase innerhalb eines "Replikationsauges"

Gezeigt ist ein "Replikationsauge", in dem ein Bereich mit den Genen 5 bis 9, ausgefüllte Rechtecke, repliziert wird. Ori markiert die Lage des Replikationsursprungs innerhalb des gezeigten "Replikationsauges". Das entscheidende Ereignis, das zur Amplifikation führen kann, ist ein Strangwechsel der DNA-Polymerase (Schritt 1). In dem gezeigten Fall vollzieht sich der Wechsel vom "Leading"- zum "Lagging"-Strang innerhalb eines Alu-Elements (schraffiertes Rechteck). Der zuvor synthetisierte "Lagging"-Strang wird durch den neu zu synthetisierenden Strang verdrängt. Die erneute DNA-Synthese auf dem "Lagging"-Strang kann entweder "spontan" abbrechen (Schritt 2) oder die Polymerase wechselt auf den Ausgangsstrang zurück (Schritt 3). Anhand des gezeigten Vorgangs kann die Ausbildung einer Struktur, wie sie an der "Kopf-Kopf"-Verknüpfung der Amplicons II und III vorhanden ist (Abb. 34), erklärt werden.

Mit den bisher diskutierten Vorgängen läßt sich die Amplifikation der W-Regionen, nicht jedoch deren Transposition auf den langen Arm von Chromosom 2 erklären. Prinzipiell können die Transpositions- und Amplifikationsvorgänge als voneinander unabhängige Ereignisse oder als mechanistisch gekoppelte Vorgänge betrachtet werden. Im ersten Fall wäre denkbar, daß zunächst eine Transposition einer Vorläuferregion, entweder durch perizentrische Inversion oder über episomale Zwischenprodukte und deren Integration, erfolgte. Die so entstandene zentromernah Lage dieser Region könnte deren Amplifikationen begünstigt haben. Ein solcher chromosomaler Positionseffekt auf die Amplifikationsrate konnte für transfizierte CAD-Gene gezeigt werden. Dabei werden diejenigen Gene, die zentromernah integrieren, bevorzugt amplifiziert (153).

Bei der zweiten Möglichkeit, der Kopplung von Amplifikations- und Transpositions Vorgang, würde das "Replikationsauge", in dem überrepliziert wurde, aus dem Chromosom herausgeschnitten und an einer anderen Stelle wieder ins Genom integriert; im Fall der W-Regionen erfolgte die Integration auf dem langen Arm von Chromosom 2. Ein solcher Mechanismus wird unter anderem für Vorgänge bei der Amplifikation und Transposition von Adenylatdesaminasegenen diskutiert (54). Anhand der vorliegenden Strukturdaten der W-Regionen kann zwischen den beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden.

3.7. Mögliche Bedeutung der CTC und NFIII-verwandten Sequenzelemente für die Entstehung bzw. weitere Amplifikation des Gens Chr22-5

Die in den Kapiteln 2.4. ff beschriebenen Versuche zielten darauf ab, in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5, eines Mitglieds einer Gruppe amplifizierter V_K I-Orphongene, Sequenzelemente zu identifizieren, die möglicherweise an dessen Entstehung bzw. weiterer Amplifikation beteiligt waren. Dazu wurde ein zellulärer Transformationstest verwendet, der es ermöglichen sollte, autonom replizierende Sequenzen (ARS) zu identifizieren (49). Voraussetzung für deren Identifizierung ist jedoch, daß die in die Ltk⁻-Zellen

eingebrachten, rekombinanten ptk-Plasmide ausschließlich als extrachromosomale Kopien existieren. Nur so ist gewährleistet, daß deren Replikation ausschließlich durch die in ihnen enthaltenen Fremdsequenzen ermöglicht wird. Sobald Integration der ptk-Plasmide in das zelluläre Genom erfolgt, können sie intrachromosomal repliziert werden, ohne daß die in den Plasmiden enthaltenen Fremdsequenzen ARS-Aktivität besitzen müssen. Zu dem Zeitpunkt, an dem die eigenen Versuche durchgeführt wurden, wurde davon ausgegangen, daß die rekombinanten ptk-Plasmide ausschließlich extrachromosomal vorliegen und somit deren Replikation nur durch die in ihnen enthaltenen Fremdsequenzen ermöglicht wird. Spätere Versuche von R. Mocikat aus unserem Labor und F. Grummt in Zusammenarbeit mit U.H. Weidle, Penzberg, und J. Wienberg, München, zeigten jedoch, daß bereits innerhalb weniger Tage nach Transfektion der Plasmide in die Zellen die Zahl der extrachromosomal vorliegenden Kopien sehr niedrig ist. Die meisten Plasmide sind zu diesem Zeitpunkt in Chromosomen integriert (R. Mocikat, persönliche Mitteilungen; 38, 154, 156). Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich keine eindeutigen Aussagen über die Eigenschaften der untersuchten Sequenzen machen. Es kann lediglich festgestellt werden, daß die identifizierten CTC und NFIII-verwandten Sequenzelemente in der Lage sind, Ltk⁻-Zellen zum tk⁺-Phänotyp zu transformieren. Zur Erzeugung von tk⁺-Klonen müssen mindestens 20 Kopien der ptk-Plasmide in jeder Zelle vorhanden sein, um die verringerte tk-Promotorstärke (5% des Wildtyps) durch einen Gendosiseffekt zu kompensieren. Der Mechanismus, der zur Erzeugung der zur Transformation benötigten Anzahl an ptk-Kopien pro Zelle führt, ist unklar. Die Frage, ob der Integration der ptk-Plasmide deren episomale Replikation vorausgehen muß, z.B. um eine ausreichend hohe Kopienzahl integrierbarer Plasmide zu erzeugen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu beantworten.

Die einzige Aussage, die sich anhand der Transformationsexperimente machen läßt ist die, daß mit Fragmenten ohne CTC- bzw. NFIII-Element die Transformation der Ltk⁻-Zellen zum tk⁺-Phänotyp nicht funktioniert (2.4.3.).

Auffallend an den Ergebnissen, die sich aus den Analysen der Fragmente aus der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 ergaben, ist, daß jeweils Kombinationen von CTC und NFIII-verwandten Elementen in

218-2 und 218-3 vorkommen. Obwohl jedes Sequenzelement für sich ausreicht, um tk^- -Zellen zu tk^+ -Zellen zu transformieren (Tabelle 6), könnte das Vorhandensein mehrerer verschiedener Elemente in der 5'-Flanke eines Chr22-5-Vorläufergens für dessen Amplifikation von Bedeutung gewesen sein. Eine solche Anhäufung der verschiedenen Elemente innerhalb von ca. 2 kb, wie dies in der 5'-Flanke von Chr22-5 der Fall ist, konnte weder in den 1 Mb umfassenden klonierten Anteilen des K-Locus, noch in 1,2 Mb an humanen Sequenzen, die in einer Datenbank enthalten sind, gefunden werden (75). Ob bzw. in welcher Form die kombinierten CTC und NFIII-verwandten Elementen eine Amplifikation des Vorläufergens bewirkt haben könnten, z.B. durch Auslösen einer Überreplikation oder durch Erleichterung der Integration der durch Überreplikation gebildeten zusätzlichen Kopien, läßt sich wegen der geringen Aussagekraft des verwendeten Transformationstests nicht entscheiden.

3.8. Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Entstehungsschichten der Chr22- und der W-Regionen

Für die Entstehung von Multigenfamilien ist der erste Schritt, die Amplifikation eines einzelnen Vorläufergens, wahrscheinlich der kritische und am schwersten erklärbare Vorgang. Hierfür kommen im wesentlichen vier verschiedene Mechanismen in Frage: homologe und nicht-homologe ungleiche Cross-over, Retrotranskription der RNA des transkribierten Vorläufergens und Überreplikationen (Übersicht in Ref. 82). Jede zusätzlich gebildete Kopie des Vorläufergens sollte die Wahrscheinlichkeit, weitere Duplikate zu bilden, erhöhen, da jede Kopie für sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit amplifiziert werden kann. Diesen Vorgängen, die zu einer Erhöhung der Kodierungskapazität, d.h. der "Expansion" einer Multigenfamilie, führen, wirken solche Ereignisse entgegen, die eine Verminderung der Kodierungskapazität, d.h. eine "Kontraktion" der Multigenfamilie, zur Folge haben. Für letzteres kommen z.B. Deletionen von Genen oder Mutationen, die zu Pseudogenen führen, in Betracht.

Im Falle der Immunglobulingene ist die Transposition von V-Genen ein weiterer Mechanismus, der zu einer Verminderung der Kodierungskapazitäten dieser Multigenfamilien führen kann. Obwohl in diesen Fällen das tranlozierte V-Gensegment für eine funktionelle variable Proteindomäne kodieren kann, ist dessen Umlagerung an J-Segmente, was eine Voraussetzung für die Bildung einer vollständigen leichten Kette ist, unter Umständen nicht mehr möglich.

Im folgenden werden gemeinsame und unterschiedliche Vorgänge während der Evolution der Chr22- und der W-Regionen, besonders im Hinblick auf deren Konsequenzen für die Kodierungskapazität der V_K -Multigenfamilie, diskutiert.

In Abb. 36 ist eine Folge von Ereignissen gezeigt, wie sie sich möglicherweise während der Evolution der Chr22- und der W-Regionen abspielten. Für letztere wurden bereits in Kapitel 3.5. weitere Möglichkeiten diskutiert. Betrachtet man die Vorgänge, die zur Entstehung der beiden Regionen geführt haben könnten unter dem Gesichtspunkt größtmöglicher Gemeinsamkeiten, so wurden zunächst zwei Blöcke mit jeweils fünf Genen nicht-duplikativ transponiert; nicht-duplikativ deshalb, weil das Vorkommen einer "Mutterkopie" der W- bzw. Chr22-Regionen innerhalb des K-Locus unwahrscheinlich ist. In keinem der durchgeführten Hybridisierungsexperimente, weder in den in situ-Hybridisierungen (2.3.2.3. und 2.4.) noch im Rahmen der PFG-Analysen (2.3.2.2.2.), konnten Hinweise auf die Existenz möglicher "Mutterkopien" im K-Locus gefunden werden. Die beiden transponierten Blöcke sind als die Vorläufer der W- bzw. Chr22-Region anzusehen. Die Transpositionen könnten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Evolution stattgefunden haben. Beide Blöcke integrierten in zentromernahen Bereichen, entweder auf Chromosom 22, in die Bande 22q11 (Chr22-Region; K. Huebner und C.M. Croce, persönliche Mitteilungen; 3), oder auf Chromosom 2, in die Bande 2q11 (W-Region). Anschließend wurden Teile dieser Regionen amplifiziert.

Ein Unterschied zwischen den weiteren Vorgängen in der Evolution der W- bzw. Chr22-Region besteht darin, daß im Falle der W-Region die gebildeten Amplicons am Ort ihrer Entstehung in das Genom integriert wurden, die amplifizierten Abschnitte der Chr22-Region hingegen werden über das Genom verteilt; diese stellen ihrerseits die Vorläufer der Z- (147) bzw. Chr1-Familie (76) dar.

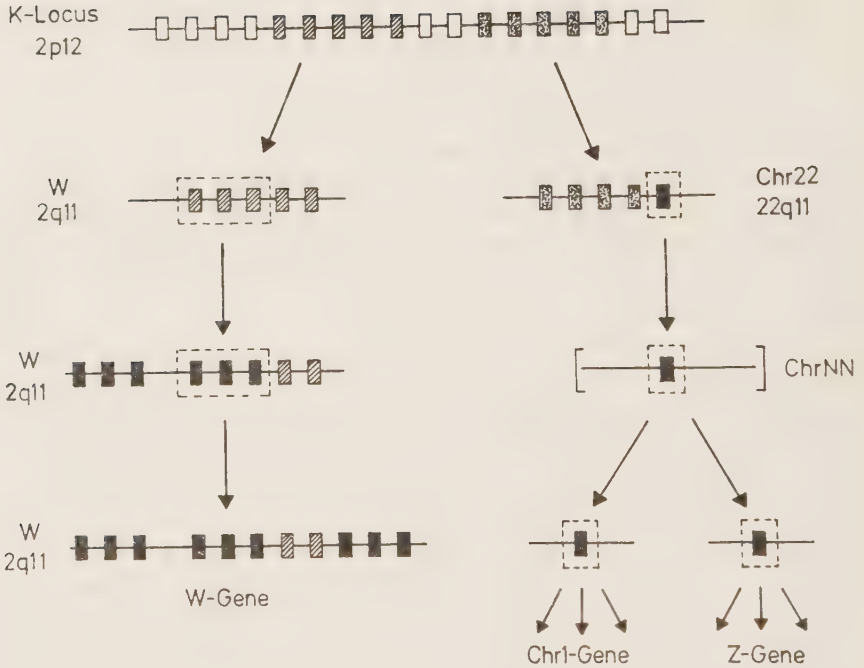


Abb. 36: Hypothetisches Modell der Evolution menschlicher Orphon-regionen

Das dargestellte Schema stellt die Erweiterung eines von E. Löt-scher vorgeschlagenen Modells der Entstehung menschlicher Orphon-regionen (77) dar. Die Gene einer W- bzw. Chr22-Vorläuferregion, die innerhalb des K-Locus lokalisiert waren, sind als schraffier-te bzw. gepunktete Rechtecke dargestellt. Nicht von Transpositio-nen betroffene Gene des K-Locus sind durch offene Rechtecke ge-kennzeichnet. Die Anordnung der beiden Vorläuferregionen inner-halb des K-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p12) ist willkürlich gewählt. Nach den erfolgten Transpositionen der Vor-läufer in die Banden 2q11 (W-Region) bzw. 22q11 (Chr22-Region) wurden bestimmte Abschnitte dieser Regionen amplifiziert. Die von den Amplifikationen betroffenen Gene sind durch gestrichelt ge-zeichnete Rechtecke eingerahmt. Amplifizierte Gene sind durch ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Die chromosomalen Zuordnungen der Vorläufer der Chr1- bzw. Z-Familie sind nicht möglich ge-wesen, weshalb deren Lokalisation als ChrNN angegeben ist.

Die Lokalisierung der V_K I-Orphonregionen auf verschiedenen Chromosomen läßt auf episomal vorliegende Amplicons als Produkte der Überreplikation schließen; deren Integration erfolgte "zufällig" an verschiedenen Stellen im Genom. Die zusammenhängenden Amplicons der W-Regionen hingegen sollten nach erfolgter Überreplikation ohne vorherige episodale Zwischenstufe ins Chromosom integriert worden sein.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Amplicons der Chr22- und der W-Regionen besteht darin, daß die in der 5'-Flanke des Gens Chr22-5 gefundenen CTC- und NFIII-Elemente innerhalb der W-Kopien nicht gefunden werden konnten (2.4.4.). Dies könnte, wie die oben erwähnten unterschiedlichen Zwischenprodukte bei den Amplifikationen der Chr22-5- bzw. W-Region, dafür sprechen, daß die Überreplikation der Gene W7 bis W9, die weder ein CTC- noch ein NFIII-Element in den 5'-Flanken besitzen, nach einem anderen Mechanismus erfolgt ist als die Amplifikation von Chr22-5.

Obwohl die bisher geschilderte Kette von Ereignissen zu einer Erhöhung der Anzahl an V_K -Genen im Genom führte, trugen diese Vorgänge dennoch zur Verminderung der Kodierungskapazität des K-Locus bei. Durch die erfolgten Transpositionen wurden insgesamt 10 Gene (W5 bis W9 bzw. Chr22-1 bis Chr22-5) dem für Umlagerungen benutzten Repertoire an V_K leichten Ketten entzogen.

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien und Enzyme

Bactoagar und Bactotrypton lieferte die Firma Difco, Detroit, USA; Hefeextrakt wurde von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. SeaKem Agarose und Seaplaque Agarose stammte von Marine Colloids, Rockland, USA, LMP Agarose von der Firma GIBCO BRL GmbH, Eggenstein und Agarose Typ II von der Sigma GmbH, Deisenhofen. Alle anorganischen Reagenzien, sowie Ethidiumbromid, Polyethylenglykol 6000, Kanamycin und Tris wurden von Merck, Darmstadt, bezogen. Ampicillin ("Amblosin") lieferte die Bayer AG, Leverkusen. N-Lauroylsarkosin (Na-Salz) und SDS waren Produkte der Firma SERVA, Heidelberg. Ribonuklease A, Rinderserumalbumin (BSA), 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal), 5-Aza-Cytidin und Polyvinylpyrrolidin stammten von Sigma, Deisenhofen. Von Serva, Heidelberg, stammte Acrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED); Bisacrylamid war ein Produkt der Firma Biomol, Ilversheim. Den Mischbettionenaustauscher AG 501-X8 lieferte die Firma Bio Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien. Methacryloxypropyltrimethyloxysilan stammte von Wacker-Chemie, München, das Dimethyldichlorsilan von BDH Chemicals Ltd. Poole, England. Die radioaktiven Nukleotide (α - 32 P)dATP, (α - 32 P)dCTP, (γ - 32 P)ATP, (α - 35 S)dATP und die Nylonmembranen Gene Screen und Gene Screen plus wurden von New England Nuclear (NEN), Dreieich, bezogen. Desoxyribonukleotide, Tris und Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) stammte von Boehringer, Mannheim. Ficoll 400 und Sephadex G50 wurden von der Pharmacia GmbH, Freiburg, geliefert. Für die Sequenzierung von M13-Klonen wurden alle benötigten Reagenzien von United States Biochemical Cooperation, Cleveland, USA, bezogen.

Die verwendeten Restriktionsnukleasen stammten von Boehringer, Mannheim, mit Ausnahme von BssHII, NotI, SfiI und SacII, die von New England Biolabs, Beverly, USA, geliefert wurden. Ebenfalls von Boehringer, Mannheim, kamen alkalische Phosphatase (Kälberdarm), Desoxyribonuklease I (Rinderpankreas), DNA-Polymerase

(E.coli, Kornberg) und T4 DNA-Ligase. Lysozym und Proteinase K wurden von SERVA, Heidelberg, bezogen. Extrakte für die in vitro-Verpackung GigapackTM Gold stammte von Genofit GmbH, Heidelberg.

4.2. Bakterienstämme, Vektoren und DNAs

Der E.coli-Stamm LE392 (supE, supf, m_K, r_K, met⁻, trpR, gal⁻), der von P. Leder entwickelt wurde (Leder, 1979), diente zur Vermehrung in vitro-verpackter λ -DNA (ci857 Sam7). Rekombinante M13-Phagen wurden in E.coli JM103 (Δ lac, pro, thi, strA, supE, endA, sbcB15, hsdR4, F["]traD36, proAB, lacI^Q, Z Δ SM15) propagiert. Der Stamm wurde von P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA, geliefert. G. Hobom, Gießen, stellte den Stamm E.coli 490A (r_K, m_K, met⁻, thr⁻, leu⁻, recA⁻) zur Verfügung. Zur Präparation von Extrakten für die in vitro-Verpackung von Cosmid-DNA wurden die beiden E. coli Stämme BHB2688 (N 205, recA⁻, ϕ _{imm}⁴³⁴, cIts, b2, red⁻, Dam, Sam/ ϕ) und BHB2690 (N 205, recA⁻, ϕ _{imm}⁴³⁴, cIts, b2, red⁻, Dam, Sam/ ϕ) eingesetzt. Die M13-Vektoren mp8, mp9, mp10 und mp11 (94) wurden von der Firma P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA, bezogen; die Vektoren mp18 und mp19 wurden von J. Messing (99) zur Verfügung gestellt. DNA der Vektoren pHC79, pBR322, pUC18 und pUC19 wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen. E.coli- und Lachsspermien-DNA stammte von Sigma GmbH, Deisenhofen. Plazenta-DNA (Individuum AF) war von A. Meindl und R. Mocikat präpariert worden, menschliche DNAs aus dem Blut verschiedener, nicht verwandter Individuen von W. Pargent (100). DNA der Zelllinien RRP5-3 (135), JI4-2L und JI6-5 (31) wurden von G. Burns, Boston, und H.-G. Klobbeck, München, zur Verfügung gestellt. Als Größenmarker für PFG wurden von G. Weichhold, München, präparierte Hefechromosomen (Stamm A836) verwendet.

4.3. Zellkultur

Die Zelllinie PC-3 (60) wurde von Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, bezogen und von Prof. Fittler, München, zur Verfügung gestellt. MEM Dulbecco Medium, fötales Kälberserum und Trypsin (2.5%) wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

4.4. Genbanken, Cosmide und Hybridisierungsklone

Für die Genbanken IIIId und IIIIe wurde mit Sau3A partiell gespaltene DNA, ligiert in pHC79 und pJB8, von H.-D. Pohlenz (106) zur Verfügung gestellt. Die Genbanken V und VI waren von W. Lorenz konstruiert worden (78). Die Genbank V, partiell gespaltene Plazenta-DNA (Individuum N), ligiert in die BamHI-Stelle des Vektors pHC79, wurde von W. Lorenz ausplattiert (78). Die Genbank VI, mit MspI partiell gespaltene Plazenta-DNA (Individuum N) wurde von W. Pargent ausplattiert (100). Aus der Zelllinie GM607 wurde von H.-G. Klobeck eine Cosmidbank konstruiert (HindIII-Partialverdau, kloniert in die HindIII-Stelle des Vektors Lorist2) und für die Versuche zur Verfügung gestellt (65). Die verwendeten Extensionssuchklone m111-7 und mAF2-10 wurden von W. Lorenz (80) und H.-G. Klobeck (65) konstruiert. Eine Zusammenstellung weiterer Proben, die für die Charakterisierung isolierter Cosmide verwendet wurden, befindet sich in der Tabelle 11.

Tabelle 11. Hybridisierungsproben (V_K -Gene und Teilbereiche) für die Charakterisierung von Cosmiden und Subklonen

Klon	Referenz	Subgruppe	Klonierter Bereich
m1-3	(56)	I	L-FR3
m1-4	*	I	L-Intron
m607-3	(64)	II	L'-FR3
m6410-1,3	(66)	II	L
m21-4	(103)	III	L-FR1
m41-7	(66)	III	FR1-FR3
m41-5	(66)	III	L-Intron
m41-3	(66)	III	5'-L
mJI-1,2	(67)	IV	Intron-FR3

(*): Derivate von m1-3 (H.-G. Klobeck, unveröffentlicht)

4.5. Ausplattieren der Genbanken IIIId und IIIe

4.5.1. Herstellung von Phagenextrakten für die in vitro-Verpackung rekombinanter Cosmidklone

Die in Vektorarme ligierte DNA läßt sich mit Hilfe zweier komplementärer Proteinextrakte aus den Bakterienstämme BHB2688 (Gefriertau-Extrakt) und BHB2690 (Ultraschall-Extrakt) in intakte Phagen verpacken (127). Die Präparation der Extrakte erfolgte wie in Ref. 106 beschrieben. Eine alternative Methode wird in Ref. 117 beschrieben. In diesem Fall geht man von dem Bakterienstamm SMR10 aus, der alle für die Verpackung benötigten Proteine produziert (116, 117). Die Qualität der hergestellten Extrakte wurde getestet, indem DNA des Bakteriophagen (Wildtyp) verpackt wurde.

In diesem Testsystem wurden mit den Extrakten der BHB-Stämme $1-3 \times 10^8$ pfu/ μ g λ DNA, den des Stammes SMR10 3×10^7 pfu/ μ g λ DNA erhalten.

4.5.2. In vitro Verpackung und Transfektion der rekombinanten Cosmidklone

Für die Genbank IIId wurden die Extrakte aus den BHB-Stämmen 2688 und 2690 zur in vitro-Verpackung verwendet. Pro Verpackungsreaktion wurden 2 μ l DNA (500 ng Plazenta-DNA), 25 μ l Gefriertau- und 10 μ l Ultraschallextrakt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 500 μ l Phagenpuffer (127) und 30 μ l Chloroform wurde die Reaktion beendet. Für die Genbank IIIe wurden die Extrakte GigapackTM Gold nach Herstellerangaben verwendet. Pro Verpackungsreaktion wurden 500 ng DNA eingesetzt. Für beide Genbanken wurde E.coli 490A als Wirtstamm verwendet. Der $recA^-$ -Status dieses Stammes wurde durch einen qualitativen Test ermittelt, indem die UV-Sensitivität dieses Stammes mit derjenigen des $recA^+$ -Stammes E.coli LE392 verglichen wurde (85). Die Induktion der Phagenrezeptoren erfolgte durch Aushungern der Bakterien mit Magnesiumsulfat (69). Zur Infektion der Zellen mit den Phagen wurden 5 Volumina Bakterienkultur mit 1 Volumen in vitro-verpackter Cosmid-DNA 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Expression der Ampicillinresistenz wurde nach Zusatz von 20 Volumina LB-Medium (4.6.2.) weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Die infizierte Bakterienkultur wurde auf Ampicillin enthaltenden LB-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin) mit aufgelegten Nylonmembranen (Gene Screen plus ausplattiert). Der Titer war so gewählt, daß pro Membranfilter (22x22 cm), nach Inkubation über Nacht bei 30°C, 50000 Kolonien heranwuchsen.

4.5.3. Herstellung der Koloniefilter und Anreicherung von Cosmidklonen

Zum Absuchen der Cosmidbanken mit Suchklonen wurden die ausplattierten Bakterienkolonien auf Koloniefilter übertragen (144, 40). Es wurden je zwei Sätze Replikafilter hergestellt. Um die Bakterienkolonien auf den Ursprungsfiltren nachwachsen zu lassen, wurden die Filter bei 37°C inkubiert; anschließend wurden sie bei 4°C auf Agarplatten aufbewahrt. Zur Lyse der abgezogenen Bakterienkolonien sowie Denaturierung und Fixierung der DNA auf den Koloniefiltren, wurde die Methode von Benton und Davis (9) verwendet. Nach Hybridisierung der Replikafilter mit Suchklonen (4.10.) war in der Regel, aufgrund der hohen Koloniedichte, das jeweilige Hybridisierungssignal nicht eindeutig einer einzelnen Kolonie zuzuordnen. Aus diesem Grunde wurden die Kolonien aus einem ca. 1 cm² großen Areal im Bereich des jeweiligen Hybridisierungssignals in LB-Medium suspendiert und erneut in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert. Von diesen Platten wurden zur Hybridisierung mit dem jeweiligen Suchklon nochmals Replikafilter hergestellt. Nach diesem Anreicherungsschritt war dann in der Regel eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Hybridisierungssignale zu einzelnen Kolonien möglich.

4.6. Präparation von DNA

4.6.1. Präparation hochmolekularer DNA in Agarosematrix

PC-3-Zellen wurden nach Trypsinisierung sedimentiert, mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit PBS auf eine Endkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Zu dieser Zellsuspension wurde das gleiche Volumen 1%-iger Agarose (LMP Agarose, BRL), ebenfalls in PBS, gegeben und in eisgekühlte Teflonschablonen gegossen. Die so in Agarose eingebetteten Zellen wurden mit 1 mg/ml Proteinase K in 0,5 M EDTA (pH 9,5) und 1% N-Lauroylsarkosin für 48 h bei 50°C inkubiert. Vor der Spaltung der DNA mit Restriktionsnukleasen wurden die Agaroseblöckchen dreimal 5 h bei 4°C mit 10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA und 0,1 mM PMSF gewaschen.

4.6.2. Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA

Cosmidklone mit den Vektoren pHCT9 oder pJB8 sowie pBR322-Klone wurden in 100 µg/ml Ampicillin enthaltendem LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, Ref. 85) über Nacht bei 37°C angezogen. Für den Cosmidvektor Lorist2 wurde dem LB-Medium 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Zur Amplifikation der Plasmid-DNA wurde der Bakterienkultur in der mittleren log-Phase ($OD_{580}=0,8$) Chloramphenicol (200 µg/ml) zugesetzt und über Nacht inkubiert. Die Aufarbeitung der Kulturen und die DNA-Isolierung erfolgten im wesentlichen nach der Methode von Birnboim und Doly (10), wobei ein weiterer Reinigungsschritt durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation im Vertikalrotor (Beckmann VTi50, 15 h, 45000 Upm) erfolgte (150). Das Ethidiumbromid wurde mit einem CsCl-gesättigten Gemisch aus n-Butanol/i-Propanol (1:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA 24 bis 36 h gegen TE-Puffer dialysiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte entweder fotometrisch bei 260 nm ($1A_{260}=50$ µg DNA/ml) oder auf Agarosegelen durch Vergleich eines Aliquots mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration.

4.6.3. Isolierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA aus M13-Klonen

Zur Anzucht von M13-Klonen wurden Kulturen von E.coli JM103 in LB-Medium in der logarithmischen Phase ($OD_{580}=0.5$) mit dem jeweiligen M13-Phagen infiziert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Doppelsträngige DNA wurde entsprechend 4.6.2. isoliert. Für die Präparation von einzelsträngiger DNA wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und der Einzelstrang aus dem Phagenüberstand nach F. Sanger (125) isoliert.

4.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

Pro analytische Spaltung wurden 0,5-1,0 µg DNA mit einem zwei- bis fünffachen Überschuß an Restriktionsnuklease 1 h inkubiert. Die Temperatur wurde entsprechend den Herstellerangaben gewählt; die Spaltung erfolgte in einem Universalpuffer: 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 15 mM Tris (pH 7,5), 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 7 mM MgCl₂ und 0,5 mM β-Mercaptoethanol. Die Spaltung wurde durch Zusatz von 20 Volumenprozent einer neutralen Lösung von 50 mM EDTA, 4 mM Harnstoff, 50% Saccharose und 0,1% Bromphenolblau beendet. Für Spaltungen von genomischer DNA und präparativer Ansätze wurden entsprechend größere Mengen eingesetzt.

Zur Spaltung von DNA, die in Agarosematrix eingebettet war, wurde die Pufferzusammensetzung und Inkubationstemperatur entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Die Agaroseblöckchen, die 10 µg DNA enthielten, wurden vor der Spaltung 1 h bei 4°C in 10 ml des jeweiligen Spaltpuffers äquilibriert. Die anschließende Restriktionsspaltung erfolgte in 150 µl Puffer mit 50-100 U Enzym für 6 h. Für Doppelspaltungen wurden die Blöckchen nach beendeter erster Spaltung umgepuffert, indem sie 1 h in dem neuen Spaltpuffer inkubiert wurden und anschließend erneut 6 h mit der zweiten Nuklease gespalten. Durch Zugabe von 100 mM EDTA (pH 8,0) wurden die Spaltungen abgestoppt.

4.8. Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

4.8.1. Konventionelle Gelelektrophorese bei konstantem, homogenem Feld

Gespaltene Cosmid- und Plasmid-DNA wurde auf horizontalen 0,3-2,0 %-igen Agarosegelen (SeaKem Agarose) aufgetrennt. Zur Elektrophorese wurde Tris-EDTA-Borat-Puffer (TEB, 90 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 90 mM Borsäure; Ref. 102) verwendet. Zur Auftrennung gespaltenen, genomischer DNA wurden 6 mm dicke 0,7%-ige Gele verwendet. Als

Längenstandard diente EcoRI- und HindIII-gespaltene DNA des Phagen (cI857 Sam7) bzw. mit HinfI gespaltene pBR322-DNA. Die Gele enthielten 1 µg/ml Ethidiumbromid und wurden unter UV-Licht fotografiert.

4.8.2. Puls-Feld-Gelelektrophorese (OFAGE)

Zur Auftrennung von DNA mit OFAGE wurden im wesentlichen die Methoden von Schwartz und Carle verwendet (132, 16, 138). Die Agarosegele (20x20 cm, 1% Agarose Typ II, Sigma) wurden für 40 bis 42 h bei 15°C in einer Elektrophoresekammer (42x42 cm) mit zwei rechtwinklig zueinander angelegten elektrischen Feldern (10,5 V/cm) betrieben. Die beiden Felder wechselten in Intervallen von 45 bis 110 s. Der Elektrophoresepuffer (0,5xTEB) wurde thermostatisiert und umgepumpt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in TEB-Puffer 30 min gefärbt. Unspezifische Anfärbung wurde durch Waschen der Gele in 0,5xTEB (2 h) entfernt. Die als Längenstandard verwendeten Hefechromosomen der Hefe A836 wurden von G. Weichhold zur Verfügung gestellt.

Die verwendete Elektrophoreseapparatur wurde von S. Mann nach den Angaben in der entsprechenden Veröffentlichung (16) konstruiert.

4.8.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Präparation von Oligodesoxyribonukleotiden

Für präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde Sea-plaque Agarose (Marine Colloids) verwendet, die bei relativ niedriger Temperatur schmilzt. Die aufgetrennten Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit einem zehntel Volumen 4 molarer NaCl-Lösung versetzt und bei 65°C geschmolzen. Nach erfolgter Phenol- und Chloroformextraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

Die von R. Stucka, München, mit einem "Biosearch 3810 DNA Synthesizer" hergestellten Oligodesoxyribonukleotide wurden entsprechend der Ref. 95 aufgereinigt.

4.9. Klonierung von DNA-Fragmenten in M13- und Plasmidvektoren

Die Vektoren wurden mit solchen Restriktionsnukleasen linearisiert, die kompatible Enden zu den zu klonierenden Fragmenten erzeugen. Bei Spaltungen mit nur einer Nuklease wurden die Vektoren mit alkalischer Phosphatase behandelt und nach zwei Phenolextraktionen ethanolgefällt. Die Ligierung der DNA-Fragmente in die Vektoren wurde bei einem fünffachen molaren Überschuß an Fragment bei 15°C über Nacht durchgeführt (29). Oligodesoxyribonukleotide wurden in einem 10-fachen molaren Überschuß in den Vektor ptk (49) ligiert.

Für die Transformation der rekombinanten M13- und Plasmid-DNA wurden E.coli JM103 bzw. 490A nach der Methode von Dagert und Ehrlich präpariert (23). Die Transformation wurde nach Messing durchgeführt (94).

Rekombinante M13-Klone bilden bei dieser Methode farblose Plaques; diese wurden mit sterilen Zahnstochern abgenommen, in 5 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur von E.coli JM103 ($OD_{580}=0,5$) überführt und 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der doppelsträngigen DNA aus der infizierten Bakterienkultur erfolgte wie in 4.6.2. geschrieben.

Rekombinante Plasmid-Klone wurden nach Selektion auf Ampicillin-Resistenz in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Birnboim und Doly (10).

4.10. DNA-Transfer auf Nylonmembranen und Hybridisierungen

Elektrophoretisch aufgetrennte Fragmente klonierter DNA wurden nach der Methode von Reed und Mann (110) auf Membranfilter (Gene Screen und Gene Screen plus) transferiert. Aufgetrennte Fragmente von Plazenta-DNA bzw. PC-3-DNA nach OFAGE, wurden nach dem Protokoll von Rigaud et. al. (113) auf Filter transferiert (Zeta-Probe, Bio Rad). In beiden Fällen wurden die Membranen bei 80°C im Vakuumofen 2 h gebacken.

Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben wurden meist die in Ref.18, seltener die in Ref. 130, beschriebenen Methoden verwendet. Bei der Hybridisierung von Koloniefiltern wurde der Hybridisierungslösung 100 µg/ml Lachsspermien-DNA, 50 µg/ml E.coli-DNA und 0,1 µg/ml M13-DNA zugesetzt. Der letzte Waschschritt erfolgte, sofern keine anderen Bedingungen angegeben sind, mit 40 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) und 1% SDS bei 68°C. Für die Autoradiographie wurden Fuji RX-Filme zusammen mit Verstärkerfolien der Typen CAWO SE6 oder Curix MRE800 bei -70°C verwendet.

4.11. Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte entweder durch "Nicktranslation" (114) oder durch "Random Priming" mit einem Hexadesoxyribonukleotidgemisch (33, 34). In beiden Fällen wurde (α -³²P)dATP und (α -³²P)dCTP zur Markierung verwendet. Waren die zur Nicktranslation verwendeten Proben kleiner als 1 kb, wurden sie vor der Markierung hochligiert (92).

Die Endmarkierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit (γ -³²P)ATP erfolgte nach Ref. 88.

4.12. Charakterisierung von Cosmidklonen durch Einzel- und Doppelspaltungen

Zur Erstellung der Restriktionskarten wurde jeweils der folgende Satz an Restriktionsnukleasen verwendet: BamHI, BglII, ClaI, KpnI, NruI, PvuI, SalI, SmaI, XhoI. Für die Einzelspaltungen wurde ein erweiterter Satz von insgesamt 15 Nukleasen benutzt. Danach wurden 10 Restriktionsnukleasen für die Doppelspaltungen ausgewählt. Jede Nuklease wurde mit jeder zur Doppelspaltung kombiniert; somit kam man auf 55 Spaltansätze pro Kartierungsgel. Die elektrophoretische Auftrennung der Einzel- und Doppelspaltungsprodukte erfolgte auf einem 0,8%-igen Agarosegel wie in

4.8.1. beschrieben. Anschließend wurde die DNA für die Hybridisierungsversuche entsprechend 4.10. auf Nylonmembranen transferiert.

4.13. DNA-Sequenzierungen

Die zu sequenzierenden Bereiche wurden durch Feinkartierung und Hybridisierungsversuche ermittelt und die entsprechenden Fragmente in M13-Vektoren kloniert (4.9.). Die Sequenzierung der M13-Einzelstrang-DNA, die nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (125) erfolgte, wurde unter Verwendung von "Sequenase" mit dem "Sequenase DNA Sequencing Kit" der Firma Genofit, Heidelberg, entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung wurde (α - ^{35}S)dATP verwendet. Die Auftrennung der synthetischen, α - ^{35}S -markierten Einzelstrang-Fragmente erfolgte auf 6%-igen Acrylamidgelen mit 8 M Harnstoff (124). Als Puffer wurde ein Tris-Borat-Puffer (133 mM Tris, 88 mM Borat, 2,5 mM EDTA) verwendet. Mit 3 unterschiedlich lang dauernden Elektrophoresen auf 40 cm langen Gelen (1,5 kV, Raumtemperatur) konnten Einzelstrang-Fragmente bis zu 600 Nukleotiden auftrennt werden. Die Autoradiographie erfolgte mit Fuji RX-Filmen bei Raumtemperatur.

4.14. Kultivieren von Zellen

Die Zelllinie PC-3 (60) wurde in MEM Dulbecco Medium, supplementiert mit 15% fötalem Kälberserum und 2 mM Glutamin, bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.15. Biologische Sicherheit

Entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neu kombinierte Nukleinsäure" (5. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamtes, Mai 1986) wurden alle Klonierungsexperimente mit menschlicher DNA unter L2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

4.16. Computerprogramme

Die aus Sequenzanalysen erhaltenen Daten wurden mit Hilfe einer Micro-VAX (Digital Equipment Corporation) ausgewertet und mit bekannten Sequenzen verglichen. Die dazu benötigten UWGCG (Version 4) Programme umfaßten BestFit, Find, Lineup, Segments und Wordsearch. Für die Sequenzvergleiche wurde die GenBank (release 44) benutzt.

5. Zusammenfassung

In der Arbeitsgruppe von Professor Zachau wird die Struktur des menschlichen K-Locus durch Isolierung und Charakterisierung überlappender Cosmid- und Phagenklone aufgeklärt. Im Rahmen dieses Projekts konnten auch V_K -Gene enthaltende Bereiche identifiziert werden, die außerhalb des K-Locus lokalisiert sind.

In der vorliegenden Dissertation wurden drei verschiedene Regionen, das sind in Form überlappender Cosmide und Phagen klonierte Abschnitte des Genoms, bearbeitet. Eine der drei Regionen ist Bestandteil des K-Locus, die beiden anderen sind außerhalb des Locus lokalisiert.

Ein als B-Region bezeichneter Abschnitt des K-Locus stellt den C_K -proximal gelegenen Bereich dar. Diese Region, die drei V_K -Gene enthält, konnte im Rahmen von "chromosomal walking"-Experimenten durch Isolierung eines rekombinanten Cosmidklons in 3'-Richtung extendiert werden. Die Charakterisierung des isolierten Klons zeigte, daß dieser die B- mit der C_K -Region verknüpft. Damit war es zum ersten mal gelungen, in einem Immunglobulinlocus von Säugern den V-Gene enthaltenden Abschnitt des Locus mit dem JC enthaltenden Bereich zu verknüpfen. Danach ist das C_K -proximale V-Gen B3 23 kb von $J_K C_K$ entfernt. Die B- $J_K C_K$ -Verknüpfung erlaubte die Feststellung der Transkriptionspolaritäten von B1, B2 und B3 relativ zu $J_K C_K$. Die Kenntnis dieser Anordnung ermöglichte es, die Vorgänge, die in Zelllinien zur Umlagerung der Gene B1, B2 und B3 der B-Region an $J_K C_K$ führten, nachzuvollziehen.

Einen Einblick in Transpositions- und Amplifikationsvorgänge bei V_K -Genen erhoffte man sich von der Analyse der Chr22-Region. Diese repräsentierte zu Beginn der eigenen Arbeiten einen Bereich von Chromosom 22, der drei V_K -Gene enthielt. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Charakterisierung des Cosmidklons cos218 zeigte, daß dieser Klon die Chr22-Region extendiert und der erweiterte Bereich zwei zusätzliche V_K -Gene enthält. Danach enthält die auf Chromosom 22 transponierte Region fünf V_K -Gene innerhalb von 30 kb. Eines der Gene, das Gen

Chr22-5, ist Mitglied einer Gruppe eng verwandter, auf verschiedenen Chromosomen lokalisierter V_K I-Orphonregionen, die im Verlauf der Evolution wahrscheinlich durch Amplifikationen aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind.

Da in der Arbeitsgruppe bereits verschiedene V_K I-Orphonregionen nach Sequenzelementen abgesucht wurden, die möglicherweise an der Amplifikation und Transposition der Orphons beteiligt waren, wurde das Gen Chr22-5 in die gleichen Untersuchungen miteinbezogen. In Zusammenarbeit mit F. Grummt, Würzburg, konnten durch Transfektionsexperimente mit Fragmenten aus der 5'-Flanke von Chr22-5 und deren Sequenzanalysen zwei verschiedene Sequenzelemente identifiziert werden. Diese als CTC und NFIII-verwandt bezeichneten Elemente sind in der Lage, Ltk⁻-Zellen zum tk⁺-Phänotyp zu transformieren. Der Mechanismus, der der Transformation zugrundeliegt, ist unklar. Die gefundenen Sequenzelemente könnten einen Einfluß auf die Transfektionseffizienz, die Inkorporation der transfektierten Klone in Chromosomen oder deren Replikation haben. In weiteren Experimenten gilt es, den durch die CTC- und NFIII-Elemente verursachten Effekt im Transformationstest zu klären.

Den Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation bildeten die Untersuchungen zur Struktur und Organisation der W-Regionen. Zu Beginn der eigenen Arbeiten waren bereits Anteile zweier Regionen, als Wa und Wb bezeichnet, analysiert. Innerhalb dieser beiden Kopien waren drei (Wa) bzw. fünf (Wb) verschiedene V_K -Gene lokalisiert worden. In einer Reihe eigener "chromosomal-walking"-Experimente konnte die Wb-Region durch Isolierung und Charakterisierung überlappender Cosmidklone extendiert sowie eine dritte W-Kopie (Wc) neu identifiziert werden. Innerhalb der drei W-Regionen konnten insgesamt 11 V_K -Gene identifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Strukturaufklärungen der W-Regionen zeigte sich, daß diese Regionen sich in mehreren strukturellen Merkmalen vom K-Locus unterscheiden. Diese Unterschiede bestehen darin, daß die W-Kopien ausschließlich Pseudogene enthalten, Abschnitte dieser Regionen in mehr als zwei Kopien (bis zu vier Kopien) im Genom vorkommen und eine dieser Regionen (Wb) eine große invertierte Du-

plikation von 40 kb enthält. Diese Befunde waren der Anlaß, die genomische Organisation der W-Regionen unter Verwendung von Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFG) genauer zu analysieren.

Die PFG-Experimente zeigten, daß die W-Regionen vier verschiedene, amplifizierte Abschnitte (Amplicons) enthalten, die invertiert angeordnet sind. Die einzelnen Amplicons sind zwischen 130 und 170 kb groß und sind innerhalb eines Bereichs von 650 kb lokalisiert. Diese von der Organisation des K-Locus sehr verschiedene Struktur der W-Regionen legte den Verdacht nahe, daß die W-Kopien keinen funktionellen Bestandteil des K-Locus darstellen. Dieser Verdacht wurde durch die Sequenzanalysen der drei W-Gene W4, W8 und W11 erhärtet. Die drei analysierten Gene stellen, wie die übrigen Gene der W-Regionen, Pseudogene dar. Dieser Befund steht in Einklang mit den Daten bisher analysierter Gene aus transponierten Regionen, sogenannten Orphons, welche ausschließlich Pseudogene darstellen.

Der Orphoncharakter der W-Regionen konnte durch Analysen somatischer Zellhybride mit Klonen aus dem K-Locus und den W-Regionen bestätigt werden; danach sind die W-Kopien 5' vom K-Locus, d.h. zentromer-proximal zu diesem, lokalisiert. Eine genauere chromosomale Lokalisierung der W-Regionen gelang im Rahmen einer Zusammenarbeit mit H. Hameister, Universität Ulm. Mit Hilfe von in situ-Hybridisierungen konnten die Regionen Wa, Wb und Wc auf dem langen Arm von Chromosom 2, in der Bande 2q11, lokalisiert werden. Der Mechanismus, der zur Transposition der W-Regionen oder einer entsprechenden Vorläuferregion führte, ist bisher unklar. Die W-Kopien stellen die ersten auf Chromosom 2 identifizierten Orphons dar.

Aufschlüsse über die zeitliche Abfolge der Entstehung der vier verschiedenen Amplicons innerhalb von Wa, Wb und Wc wurden durch Vergleiche von Sequenzen triplizierter Gene (W11/W9/W3; W10/W8/-W2; W4/W7/W1) erhalten. Jedes der in den jeweiligen Sequenzvergleich einbezogenen Gene stammte aus einem unterschiedlichen Amplicon. Eine Aussage über die Evolution der W-Regionen anhand der Ergebnisse aus den Sequenzvergleichen war deshalb möglich, weil sich Duplikate, die zu einem frühen Zeitpunkt während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind, in ihren Sequenzen stärker unterscheiden als solche, die zu einem späteren

Zeitpunkt entstanden sind. Danach ist das Amplicon I innerhalb der Wa-Region mit den Genen W1, W2 und W3 zu einem früheren Zeitpunkt in der Evolution als das Amplicon III innerhalb von Wb mit den Genen W4, W10 und W11 entstanden. Anhand dieser Daten und der Ergebnisse aus den PFG-Experimenten wurde ein Modell der Evolution der W-Regionen entwickelt (Abb. 35). Danach läßt sich die Entstehung der W-Regionen aus einer Vorläuferregion als Folge zweier Duplikationsereignisse erklären. Bei beiden Duplikationen werden ca. 150 bzw. 300 kb große Abschnitte einer Vorläuferregion derart amplifiziert, daß das neu gebildete Duplikat invertiert zur Ausgangssituation angeordnet ist.

Zur Klärung des Mechanismus, nach dem die Amplifikationen erfolgt sein könnten, wurden die Sequenzen an den Übergängen zweier Amplicons zu nicht-amplifizierten Abschnitten ermittelt. Aus den Sequenzdaten geht hervor, daß sich an diesen Stellen Fragmente von Alu-Elementen befinden (Abb. 35). Anhand dieser Daten wurde ein Mechanismus postuliert, mit dem die Entstehung invertiert angeordneter Amplicons zu erklären ist. Danach ist das entscheidende Ereignis während der Überreplikation einer W-Vorläuferregion ein Strangwechsel der DNA-Polymerase innerhalb der Replikationsgabel. Dieser Wechsel ist innerhalb von Alu-Elementen, welche an den Grenzen der Amplicons I und III vorkommen, erfolgt.

6. Literaturverzeichnis

1. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents" (1970) Eur. J. Biochem. 15, 203-208
2. "Abbreviations and Symbols" (1977) Eur. J. Biochem. 74, 1-6
3. Adolph, S., Hameister, H., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 6241
4. Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1707-1711
5. Alt, F., Kellems, R., Bertino, J.R., Schimke, R.T. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1357-1370
6. Ardeschir, F., Giulotto, E., Zieg, J., Brison, O., Liao, W.S.L. und Stark, G.R. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 2076-2088
7. Barlow, D.P. und Lehrach, H. (1987) Trends Genet. 3, 167-171
8. Bauer, H.G. (1986) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
9. Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977) Science 196, 180-182
10. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523
11. Botchan, M.W., Topp, W. und Sambrook, J. (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 709-719
12. Breathnach, R. und Chambon, P.A. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383
13. Brown, W.R.A. und Bird, A. (1986) Nature 322, 477-481
14. Bullock, P. und Botchan, M. (1982) Gene Amplification, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 215-224
15. Burke, D.T., Carle, G.F. und Olson, V. (1987), Science 236, 806-812
16. Carle, G.F. und Olson, M.V. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5647-5664
17. Childs, G., Maxson, R., Cohn, R.H. und Kedes, L. (1981) Cell 23, 651-663
18. Church, G.A. und Gilbert, W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995

19. Clarke, L. und Carbon, J. (1976) Cell 9, 91-99
20. Collins, J. und Hohn, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4242-4246
21. Collins, J. und Brünig, H.J. (1978) Gene 4, 85-107
22. Coulson, A., Waterston, R., Kiff, J., Sulston, J. und Kohara, Y. (1988) Nature 335, 184-186
23. Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979) Gene 6, 23-28
24. D'Ambrosio, E. und Furano, A.V. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 3155-3175
25. Davis, M.M. und Bjorkman, P.J. (1988) Nature 334, 395-402
26. de Klein, A., van Agthoven, T., Groffen, L., Heisterkamp, N., Groffen, J. und Grosveld, G. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 7071-7082
27. D'Eustachio, P., Meyuhas, O., Ruddle, F. und Perry, R.P. (1981) Cell 24, 307-312
28. Donis-Keller, H. et al. (1987) Cell 51, 319-337
29. Dugaiczky, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975) J. Mol. Biol. 96, 171-184
30. Erbslöh, H. (1974) Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Freiburg
31. Erikson, J., Nishikura, K., Ar-Rushdi, A., Finan, J., Emanuel, B., Lenoir, G., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7581-7585
32. Falkner, F. und Zachau, H.G. (1984) Nature 310, 71-74
33. Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132, 6-13
34. Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266-267
35. Feldmann, H. (1977) Nucl. Acids Res. 4, 2831-2841
36. Ford, M. und Fried, M. (1986) Cell 45, 425-430
37. Fritsch, E.T., Lawn, R.A. und Maniatis, T. (1980) Cell 19, 959-927
38. Grummt, F. (1989) Cell 56, 143-144
39. Hamlin, J.L., Milbrandt, J.D., Heintz, N.H. und Azizkhan, J.C. (1984) Int. Rev. Cytol. 90, 31-82

40. Hanahan, D. und Meselson, M. (1983) *Methods in Enzymology* 100, 333-342, Academic Press, New York
41. Hardy, D.A., Bell, I.J., Long, E.O., Lindsten, T. und McDevitt, H.O. (1986) *Nature* 323, 453-455
42. Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., Fujisawa, J.-I., Haynes, J.R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schambock, A., Schmid, J., Todokaro, K., Wälchli, M., Nagata, S. und Weissmann, C. (1985) *J. Mol. Biol.* 185, 227-260
43. Hieter, P.A., Maizel, J.V., Leder, P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1516-1522
44. Hieter, P.A., Max, E.E., Seidman, J.G., Maizel, J.V. und Leder, P. (1980) *Cell* 22, 197-207
45. Hinds, K.R. und Litman, G.W. (1986) *Nature* 320, 546-548
46. Höchtel, J., Müller, C.R. und Zachau, H.G. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1383-1387
47. Hohn, B. und Murray, K. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3259-3263
48. Hohn, B. und Collins, J. (1980) *Gene* 11, 291-298
49. Holst, A., Müller, F., Zastrow, G., Zentgraf, H., Schwender, S., Dinkl, E. und Grummt, F. (1988) *Cell* 52, 355-365
50. Honjo, T. und Habu, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 803-830
51. Huber, E. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
52. Huber, C. (1986) Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
53. Hyrien, O., Debatisse, M., Buttin, G. und de Saint Vincent, B.R. (1987) *EMBO J.* 6, 2401-2408
54. Hyrien, O., Debatisse, M., Buttin, G. und de Saint Vincent, B.R. (1988) *EMBO J.* 7, 407-417
55. Iwashima, M., Green, A., Davis, M.M. und Chien, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8161-8165
56. Jaenichen, H.-R., Pech, M., Lindenmaier, W., Wildgruber, N. und Zachau, H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 5249-5263
57. Jagadeeswaran, P., Forget, B.G., Weissman, S.M. (1981) *Cell* 26, 141-142
58. Johnston, R.N., Beverley, S.M. und Schimke, R.T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3711-3715

59. Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.P. und Gottesmann (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publications
60. Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. und Jones, L.W. (1979) *Inv. Urol.* 17, 16-23
61. Kariya, Y., Kato, K., Hayashizaki, Y., Himena, S., Tarui, S. und Matsubara, K. (1987) *Gene* 53, 1-10
62. Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4591-4603
63. Klobeck, H.-G., Combriato, G. und Zachau H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 6995-7006
64. Klobeck, H.-G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1984) *Nature* 309, 73-76
65. Klobeck, H.-G., Zimmer, F.-J., Combriato, G. und Zachau H.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 9655-9665
66. Klobeck, H.-G., Meindl, A., Combriato, G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 6499-6513
67. Klobeck, H.-G., Bornkamm, G.W., Combriato, G., Mocikat, R., Pohlenz, H.-D. und Zachau, H.G. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 6515-6529
68. Lai, E., Concannon, P. und Hood, L. (1988) *Nature* 331, 543-546
69. Leder, P. Tiemeier, D. und Enquist, L. (1977) *Science* 196, 175-177
70. Lehrmann, M.A., Russel, D.W., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3354-3361
71. Lenoir, G.M., Preud'homme, J.L., Bernheim, A. und Berger, R. (1982) *Nature* 298, 474-476
72. Lewis, S., Rosenberg, N., Alt, F. und Baltimore, D. (1982) *Cell* 30, 807-816
73. Lindsay, S. und Bird, A.P. (1987) *Nature* 327, 336-338
74. Lötscher, E. (1988) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
75. Lötscher, E., Siwka, W., Zimmer, F.-J., Grummt, F. und Zachau, H.G. (1988) *Gene* 69, 225-236
76. Lötscher, E., Grzeschik, K.-H., Bauer, H.G., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1986) *Nature* 320, 456-458

77. Lötscher, E., Zimmer, F.-J., Klopstock, T., Grzeschik, K.H., Jaenichen, R., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1988) *Gene* 69, 215-223
78. Lorenz, W. (1989) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
79. Lorenz, W., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 9667-9676
80. Lorenz, W., Schäble, K.F., Thiebe, R., Stavnezer, J. und Zachau, H.G. (1988) *Mol. Immunol.* 25, 479- 484
81. Ma, L., Looney, J.E., Leu, T.-H. und Hamlin, J.L. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 2316-2327
82. Maeda, N. und Smithies, O. (1986) *Ann. Rev. Genet.* 20, 81-108
83. Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Ferguson-Smith, M.A., Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4957-4961
84. Malissen, M., McCoy, C., Blanc, D., Trucy, J., Devaux, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Fitch, F., Hood, L. und Malissen, B. (1986) *Nature* 319, 28-33
85. Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
86. Margulies, D.H., Evans, G.A., Flaherty, L. und Seidman, J.G. (1982) *Nature* 295, 168-170
87. Marsh, P., Mills, F. und Gould, H. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 6530-6544
88. Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980) *Methods in Enzymology* 65, 499-560
89. McBride, O.W., Hieter, P.A., Hollis, G.F., Swan, D., Otey, M.C. und Leder, P. (1982) *J. Exp. Med.* 155, 1480-1490
90. McKnight, S.L., Kingsbury, R.C., Spence, A. und Smith, M. (1984) *Cell* 37, 253-262
91. McKusick, V.A. und Ruddle, F.H. (1977) *Science* 196, 390-405
92. Meinkoth, J. und Wahl, G. (1984) *Analyt. Biochem.* 138, 269-284
93. Mellor, A.L., Weiss, E.H., Ramachandran, K. und Flavell, R.A. (1983) *Nature* 306, 792-794
94. Messing, J. (1983) *Methods in Enzymology* 101, 20-78

95. Mocikat, R., Falkner, F.G., Mertz, R. und Zachau, H.G. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 8829-8844
96. Morrow, J.F. (1980) Methods in Enzymology 68, 3-24 Academic Press, New York
97. Morton, N.E., Lindsten, J., Iselius, L. und Yee, S. (1982) Hum. Genet. 62, 266-270
98. Nicholls, R.D., Fischel-Ghodsian, N. und Higgs, D.R. (1987) Cell 49, 369-378
99. Norander, J., Kempe, T. und Messing, J. (1983) Gene 26, 101-106
100. Pargent, W. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
101. Passananti, C., Davies, B., Ford, M. und Fried, M. (1987) EMBO J. 6, 1697-1703
102. Peacock, A.C. und Dingman, C.W. (1967) Biochemistry 6, 1818-1827
103. Pech, M. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 9229-9236
104. Pech, M., Jaenichen, H.R., Pohlenz, H.-D., Neumeier, P.S., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1984) J. Mol. Biol. 176, 189-204
105. Pech, M., Smola, H., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Gerl, R. und Zachau, H.G. (1985) J. Mol. Biol. 183, 291-299
106. Pohlenz, H.-D. (1986) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
107. Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1987) J. Mol. Biol. 193, 241-253
108. Pruijn, G.J.M., van Driel, W. und van der Vliet, P.C. (1986) Nature 322, 656-659
109. Quenzel, M. (1988) Dissertation, Fakultät für Medizin der Universität München
110. Reed, K.C. und Mann, D.A. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 7207-7221
111. Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A. und Weill, J.C. (1985) Cell 40, 283-291
112. Rigas, B., Welcher, A.A., Ward, D.C., Weissmann, S.M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9591-9595

113. Rigaud, G., Grange, T. und Pitet, R. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 857
114. Rigby, P.W.J., Dieckmann, A., Rhodes, C. und Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237-251
115. Roberts, J.M., Buck, L.B. und Axel, R. (1983) Cell 33, 53-63
116. Rosenberg, S.M. (1985) Gene 39, 313-315
117. Rosenberg, S.M., Stahl, M.M., Kobayashi, I. und Stahl, F.W. (1985) Gene 38, 165-175
118. Rosenfeld, P.J., O'Neill, E.A., Wides, R.J. und Kelly, T.J. (1987) J. Mol. Biol. 7, 875-886
119. Rouyer, F., Simmler, M.-C., Page, D.C. und Weissenbach, J. (1987) Cell 51, 417-425
120. Ruiz, J.C. und Wahl, G.M. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 4302-4313
121. Saito, I. und Stark, G.R. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8664-8668
122. Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G. und Tonegawa, S. (1979) Nature 280, 288-294
123. Sambrook, J., Botchan, M., Gallimore, P., Ozanne, B., Pettersson, U., Williams, J. und Sharp, P.A. (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 615-632
124. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
125. Sanger, F. Coulson, A.R., Barnell, B.G., Smith, A.J.H. und Roe, B.A. (1980) J. Mol. Biol. 143, 161-178
126. Sato, T., Matsuda, F., Lee, K.H., Shin, E.K. und Honjo, T. (1988) Biochem. Biophys. Res. Com. 154, 265-271
127. Scalenghe, F., Turco, E., Edström, J.E., Pirotta, V. und Melli, F. (1981) Chromosoma 82, 205-216
128. Schimke, R.T. (1984) Cell 37, 705-713
129. Schimke, R.T. (1988) J. Biol. Chem. 263, 5989-5992
130. Schnell, H., Steinmetz, M., Zachau, H.G. und Schechter, I. (1980) Nature 286, 170-173
131. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.-H., Varmus, H.E., Bishop, J.M. et al. (1983) Nature 305, 245-248

132. Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984) Cell 37, 67-76
133. Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. und Cantor, C.R. (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 189-195
134. Seidman, J.G., Nau, M.R., Norman, B., Kwan, S.-P., Scharff, M. und Leder, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6022-6026
135. Shiloh, Y., Shipley, J., Brodeur, G.M., Bruns, G., Korf, B., Donlan, T., Schreck, R.R., Seeger, R., Sakai, K. und Latt, S.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3761-3765
136. Smith, H.O. und Nathans, D. (1973) J. Mol. Biol. 81, 419-423
137. Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A. und Cantor, C.R. (1986) Genetic Engineering 8, 45-70, Plenum Press, New-York
138. Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Keco, S., Fan, J.-B., Yanagida, M. und Cantor, C.R. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 4481-4489
139. Spradling, A.C. und Mahowald, A.P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1996-2002
140. Stark, G.R. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 2089-2098
141. Stark, G.R. und Wahl, G.M. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53, 447-491
142. Stavnezer, J., Kekish, O., Batter, D., Grenier, J., Balazs, Henderson, E. und Zegers, B.J.M. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 3495-3514
143. Steinmetz, M., Winoto, A., Minard, K. und Hood, L. (1982) Cell 28, 489-498
144. Steinmetz, M., Stephen, D., Dastoorniko, G.R., Gibb, E. und Romaniuk, R. (1985) Immunological Methods III, 1-19
145. Stiller, C. (1988) Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität München
146. Straubinger, B. (1987) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
147. Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M. und Zachau, H.G. (1988) Gene 69, 209-214
148. Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34

149. Szybalska, E.H. und Szybalski, W. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 2026-2034
150. Tanaka, T. und Weisblum, B. (1975) *J. Bacteriol.* 121, 354-362
151. Tonegawa, S. (1983) *Nature* 302, 575-581
152. Van Ness, B.G., Coleclough, C., Perry, R.P. und Weigert, M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 262-266
153. Wahl, G.M., de Saint-Vincent, B.R. und Rose, M.L. (1984), *Nature* 307, 516-520
154. Weidle, U.H., Buckel, P. und Grummt, F. (1988) *Gene* 73, 427-437
155. Weiss, E.H., Golden, L., Fahrner, K., Mellor, A.L., Devlin, J.J., Bullman, H., Tiddens, H., Bud, H. und Flavell, R.A. (1984) *Nature* 310, 650-655
156. Zastrow, G., Koehler, U., Müller, F., Klavinius, A., Wegner, M., Wienberg, J., Weidle, U.H. und Grummt, F. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 1867-1879
157. Zieg, J., Clayton, C.E., Ardeshir, F., Giulotto, F., Stark, G.R. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 2089-2098
158. Zuckerkandl, M., und Pauling, L. (1962) in: *Horizons in Biochemistry*, New York Academic, 189-225

7. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
C	konstante Region der Immunglobuline
CDR	"complementarity determining region": hypervariable Abschnitte in den V-Regionen der leichten und schweren Ketten
cpm	ausgezählte Zerfälle pro Minute
D	"diversity segment": Gensegment innerhalb der V-Regionen schwerer Ketten
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	3,6-Dioxaoctamethylendinitrotetraessigsäure
FR	"framework region": Regionen, die innerhalb der variablen Bereiche der leichten und schweren Ketten die konstanten Abschnitte bilden
h	Stunden
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
H-Kette	schwere Kette der Immunglobuline
Ig	Immunglobulin
J	"joining segment": Gensegment der V-Region leichter und schwerer Ketten
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
L	"leader"-Sequenz, Signalpeptidbereich
L-Kette	leichte Kette der Immunglobuline
Mb	Megabasenpaare (10^6 bp)
min	Minuten
OD	optische Dichte
OFAGE	"orthogonal field alternation gel electrophoresis"
PBS	"phosphate buffered saline" (55 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 4,5 mM Natriumdihydrogenphosphat; 65 mM Natriumchlorid; pH 8,0)
PFG	Puls-Feld-Gelelektrophorese
pfu	Plaque-bildende Einheiten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ref.	Referenz
s	Sekunden

SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat (150 mM Natriumchlorid; 15 mM Natriumcitrat; pH 8,0)
TE	Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris; 2,5 mM EDTA; pH 8,0)
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer (90 mM Tris; 2,5 mM EDTA; 90 mM Borsäure)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	variable Region der Immunglobuline
V _K , V _λ	variable Region der leichten Ketten vom K- und λ-Typ

Bei Cosmidklonen gibt die Nummer an, aus welcher Genbank der jeweilige Cosmidklon isoliert wurde: cos1 ff aus den Genbanken I und II (56); cos100 ff aus Genbank III (107); cos500 ff aus Genbank IVb (148); cos650 ff aus Genbank IVa (148); cos607/1 ff aus Genbank 607 (65); cos750 ff aus Genbank V (78). Subklone sind mit Kleinbuchstaben und Zahlen bezeichnet. Der Buchstabe gibt den Vektor an (p=pBR322 oder pUC oder ptk, m=M13) und die Zahl das Ausgangscosmid.

Alle anderen Angaben erfolgten gemäß den Empfehlungen der "IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature" (1, 2). Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den Empfehlungen in Ref. 136.

Lebenslauf

Name: Zimmer

Vorname: Franz-Josef

Geburtsdatum: 26.09.1957

Geburtsort: Saarburg, Rheinland-Pfalz

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1964-1968 Grundschule in Greimerath
1968-1977 Gymnasium in Saarburg

Wehrdienst: Juli 1977 bis September 1978

Hochschulstudium: 1978-1985 Universität Tübingen
Studiengang Biochemie (Diplom)
Diplomarbeit im Medizinisch-Naturwissen-
schaftlichen Forschungszentrum bei
Dr. A. Ziegler
Thema: Charakterisierung von HLA-Deletionsmu-
tanten mit molekularbiologischen Methoden und
deren Verwendung zur Kartierung von Genen

Dissertation: seit 1985 am Institut für Physiologische
Chemie, Physikalische Biochemie und Zell-
biologie der Universität München, bei
Professor H.G. Zachau

